

Untersuchung des Wirkmechanismus von Peptidantibiotika an simulierten bakteriellen Membranen mit Hilfe von Biosensortechniken

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von
Saad Al-Kaddah
aus
Al-Herak, Syrien

Bonn 2011

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-
Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-
Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. Gerd Bendas
2. Gutachter: Prof. Dr. Hans-Georg Sahl
Tag der Promotion: 24.11.2011
Erscheinungsjahr: 2011

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung	11
2. Theoretische Grundlagen.....	13
2.1. Biosensoren	13
2.1.1. Quarzmikrowaage	15
2.1.2. Akustischer Oberflächenwellensensor	20
2.1.3. Zyklische Voltammetrie	26
2.1.4. Isotherme Titrationskalorimetrie.....	31
2.2. Antibiotika	39
2.3. Lantibiotika	43
2.3.1. Einteilung der Lantibiotika.....	43
2.3.2. Biosynthese der Lantibiotika.....	45
2.3.3. Nisin	46
2.3.4. Wirkspektrum Typ A Lantibiotika.....	48
2.3.5. Resistenzen gegen Nisin	48
2.3.6. Einsatz des Nisins.....	48
2.3.7. Gallidermin	49
2.3.8. Wirkspektrum des Gallidermin	50
2.3.9. Subtilin.....	50
2.3.10. Pep5	51
2.3.11. Microbisporicin	52
2.3.12. Lacticin 481 und Plantaricin C.....	52
2.3.13. Wirkmechanismus der Typ A Lantibiotika.....	53
2.3.14. Bisherige Biosensormessungen	56
2.3.15. Typ B Lantibiotika	57
2.3.16. Mersacidin	57
2.3.17. Wirkmechanismus der Typ B Lantibiotika.....	58
2.3.18. Labyrinthopeptin.....	58
2.3.19. Zwei-Komponenten Lantibiotika.....	59
2.4. Glykopeptide.....	61
2.4.1. Vancomycin	61
2.4.2. Biosynthese des Vancomycins	62
2.4.3. Wirkspektrum des Vancomycins	63
2.4.4. Wirkmechanismus des Vancomycins	63
2.4.5. Einsatz des Vancomycins	64
2.4.6. Resistenzen gegen Vancomycin	64

2.4.7. Teicoplanin	64
2.4.8. Telavancin.....	65
2.4.9. Wirkspektrum des Telavancins.....	66
2.4.10. Wirkmechanismus des Telavancins.....	66
2.4.11. Oritavancin und Dalbavancin	66
2.4.12. Bisherige Biosensormessungen.....	67
2.5. Lipopeptide.....	67
2.5.1. Daptomycin	68
2.5.2. Biosynthese des Daptomycins	69
2.5.3. Einsatz des Daptomycins	70
2.5.4. Wirkmechanismus des Daptomycins.....	70
2.5.5. Friulimicin.....	72
2.5.6. Biosynthese des Friulimicins.....	72
2.5.7. Einsatz des Friulimicins	73
2.5.8. Wirkmechanismus des Friulimicins	73
2.6. Neue Ansätze in der Antibiotikaforschung	74
2.7. Zielsetzung der Arbeit	75
3. Material und Methoden	76
3.1. Material	76
3.1.1. Messgeräte.....	76
3.1.2. Substanzen.....	76
3.1.3. Lipide	76
3.1.4. Chemikalien.....	77
3.1.5. Sonstige Materialien	77
3.2. Methoden.....	79
3.2.1. Charakterisierung der Quarzsensoren	79
3.2.2. Reinigung der Quarzsensoren.....	79
3.2.3. Beschichtung der Quarzsensoren.....	80
3.2.4. Liposomenherstellung	82
3.2.5. Liposomencharakterisierung.....	83
3.2.6. Messung mit dem QCM LiquiLab 21	83
3.2.7. Messung mit der E-QCM CHI-430	85
3.2.8. Messung mit dem SAW S-Sens K5	85
3.2.9. Messung mit dem VP-ITC.....	87
3.2.10. Messung am Fluoreszenzspektrometer.....	88
3.2.11. Durchgeführte Messungen.....	89
4. Ergebnisse und Diskussion	90

4.1. Gallidermin und Vancomycin.....	91
4.1.1. Messungen der Bindungskinetik mittels QCM	92
4.1.2. Messungen der Gallidermin-Bindungskinetik mittels SAW	95
4.1.3. Messungen der Membranaffinität mittels ITC	98
4.1.4. Fluoreszenz-Messungen der Membranfluidität	105
4.1.5. Auswertung Gallidermin und Vancomycin	106
4.2. Telavancin	108
4.2.1. Messungen der Bindungskinetik mittels QCM	109
4.2.2. Messungen der Membranaffinität mittels ITC	110
4.2.3. Auswertung Telavancin	112
4.3. Friulimicin	114
4.3.1. AFM Aufnahmen des Friulimicins an Modellmembranen.....	115
4.3.2. Messungen der Membranaffinität mittels ITC	118
4.4. Daptomycin	122
4.4.1. Messungen der Bindungskinetik mittels QCM	122
4.4.2. Messungen der Bindungskinetik mittels SAW	123
4.4.3. Messungen der Membranaffinität mittels ITC	125
4.4.4. Auswertung Daptomycin.....	127
5. Zusammenfassung	130
6. Literatur.....	133
Tabellenverzeichnis.....	144
Abbildungsverzeichnis	145
Publikationsliste.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Verfassererklärung	147
Danksagung.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.
Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
A	Ampere
Abb.	Abbildung
ABC	ATP bindende Kassette (engl. ATP Binding Cassette)
A _{eq}	Assoziation bei vollständiger Bindung
AFM	Rasterkraftmikroskopie (engl. Atomic Force Microscopy)
Aqua dem.	demineralisiertes Wasser
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AviCys	S-[(Z)-2-aminovinyl]-D-cystein
BRD	Bundesrepublik Deutschland
bzw.	Beziehungsweise
C ₀	Anfangskonzentration
C55P	Baktoprenolphosphat
Ca	Calcium
ca.	circa
cal	Kalorien
CD	Circulardichroismus
CDA	Calciumabhängiges Antibiotikum(engl. Calcium Dependent Antibiotic)
C _F	Schichtwägeempfindlichkeit
C _f	freie Peptidkonzentration
C _L ⁰	freie Lipidkonzentration
C _M	Oberflächenkonzentration
CV	Zyklische Voltammetrie (engl. Cyclic Voltammetry)
dF	absolute Frequenzabnahme
Da	Dalton
DDD	Definierte Tagesdosen (engl. Defined Daily Doses)
deg	Grad (engl. degree)
dG	Änderung der freien Enthalpie
dH	Enthalpieänderung
Dha	Didehydroalanin
Dhb	Didehydrobutyrin
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. Desoxyribonucleid acid)
DOPC	1,2-Dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
DOPG	1,2-dioleoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phospho-(1'-rac-glycerol)
dS	Entropieänderung
E. Coli	Escherichia Coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl. Enzyme Linked Immunosorbent Assay)
E _{pa}	anodisches Spitzenpotential
E _{pc}	kathodisches Spitzenpotential

E-QCM	elektrochemische Quarzmikrowaage (engl. electrochemical Quartz Crystal Microbalance)
FDA	Arzneimittel- und Lebensmittelizassungsbehörde USA (engl. Food and Drug Administration)
Fe	Eisen (lat. Ferrum)
g	Gramm
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
h	Stunde (engl. hour)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ SO ₅	Peroxomonoschwefelsäure
He	Helium
h _k	Wärmeänderung pro Injektion k
Hz	Hertz
IDT	Interdigitaler Wandler (engl. Interdigital Transducer)
I _{pa}	anodischer Spitzenstrom
I _{pc}	kathodischer Spitzenstrom
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie (engl. Isothermal Titration Calorimetry)
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie (engl. International Union of Pure and Applied Chemistry)
J	Joule
K	Geschwindigkeitskonstante
K ₀	scheinbare Bindungskonstante
K _{ap}	apparente Bindungskonstante
k _{Ass}	Assoziationskonstante
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
KDa	Kilodalton
k _{Diss}	Dissoziationskonstante
k _{obs}	Assoziation, die für eine eingesetzte Konzentration gilt
k _{off}	Dissoziationskonstante
k _{on}	Assoziationskonstante
L	Liter
L II	Lipid II
Lan	Lanthionin
LUV	Große unilamellare Vesikel (engl. large unilamellar vesicles)
M	molar
m	Meter
MC 540	Merocyanin MC 540
MeLan	Methyllanthionin
MIC	Minimale Hemmkonzentration (engl. Minimal Inhibitory Concentration)

Millipore	Isopore Wasser Typ 2
min	Minute
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MurNAc	N-Acetylmuraminsäure
MW	Molekulargewicht (engl. Molecular weight)
Ne	Neon
n _L	molarer Anteil des Lipids
NMR	Kernspinresonanz (engl. Nuclear Magnetic Resonance)
n _p	Peptidstoffmenge
NRPs	Nicht-ribosomale Peptidsynthasen
PCP	Peptidyltransportprotein (engl. Peptidyl Carrier Protein)
PCS	Photonenkorrelationsspektroskopie (engl. Photon Correlation Spectroscopy)
PG	DOPG
q	totale Wärmemenge
QCM	Quarzmikrowaage (engl. Quartz Crystal Microbalance)
s	Sekunde
SAM	Selbstauserichtete monomolekulare Schicht (engl. Self Assembled Monolayer)
SAW	akustische Oberflächenwelle (engl. Surface Acoustic Wave)
sec	Sekunde
SUV	kleine unilamellare Vesikel (engl. Small Unilamellar Vesicles)
T	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TSM	Dickenscherschwingung (engl. Thickness Shear Mode)
u.a.	unter anderem
UDP	Uridindiphosphat
V _{inj}	Injektionsvolumen
V	Volt
VRSA	Vancomycin-resistenter Staphylococcus aureus
X _b	Grad der Bindung
X _p	gebundener Anteil des Peptids
z.B.	zum Beispiel

Präfixe für Maßeinheiten nach dem internationalen SI-System

Aminosäuren 3-Buchstabencode oder 1-Buchstabencode

(#) Gleichungen

[#] Literaturquellen

1. Einleitung

Antibiotika bilden nach Analgetika und Blutdrucksenkern die dritte Gruppe der meistverordneten Arzneimittel in der Bundesrepublik Deutschland [1]. Laut dem Arzneiverordnungsreport 2008 ist das Penicillin-Derivat Amoxicillin mit 73 Millionen DDD (engl. „Defined Daily Doses“) Spitzenreiter bei der Behandlung bakterieller Infektionen [2]. Amoxicillin blockiert die Zellwandbiosynthese durch Hemmung der Transpeptidase und wirkt damit bakterizid. Die Zellwand ist ein wichtiges Kompartiment des Bakteriums und dient dem Schutz gegenüber äußeren Einflüssen und der Aufrechterhaltung des intrazellulären, osmotischen Drucks. Daher stellt die Zellwand und auch die Zellmembran einen geeigneten Angriffspunkt für Antibiotika dar.

Flemings Zufallsentdeckung des Penicillins vor knapp 80 Jahren hatte die Medizin revolutioniert, da die Heilung schwerer bakterieller Infektionen erstmals möglich war. In der Folgezeit wurde die Antibiotikaforschung voreilig für beendet erklärt, weil der antibakterielle Effekt der Wirkstoffe überschätzt worden war. Durch eine unverantwortliche Verschreibungspraxis der Ärzte einerseits und der mangelnden Compliance durch die Patienten andererseits wurde die Entstehung resistenter Bakterienstämme gefördert, gegen die nur noch wenige Reserveantibiotika Wirksamkeit zeigen.

Nach einer Hochrechnung des Robert-Koch-Institutes aus dem Jahre 2008 infizierten sich ca. 34 000 Patienten mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in deutschen Krankenhäusern. Betrachtet man die Anzahl von ca. 3 Millionen Krankenhauspatienten, so lag der Anteil an MRSA Fällen bei 132 000 Erkrankten [3]. Durch die Resistenzproblematik wurde die Notwendigkeit zur Entwicklung neuer Antibiotika und Wirkprinzipien evident. Aufgrund der Spezifität erweist sich eine Inhibierung der Zellwandbiosynthese als besonders erfolgsversprechend. In diesem Zusammenhang wurden Vertreter der Wirkstoffklasse der Lantibiotika intensiv erforscht. Diese Peptidantibiotika, die einen hohen Anteil an ungewöhnlichen Aminosäuren in ihrer Struktur tragen, wie Lanthionin oder Methyllanthionin, eignen sich herausragend als Modellsubstanzen, um den Eingriff in die Zellwandbiosynthese durch Bindung der Zellwandvorstufe (Lipid II) zu untersuchen. Durch Wirkvergleiche mit anderen Lipid II-Bindern, wie dem Glykopeptid Vancomycin, zeigte sich

allerdings, dass weitere unspezifische Mechanismen an der Wirksamkeit beteiligt sein müssen.

Zur Erforschung des Wirkmechanismus können moderne Biosensortechniken, wie z.B. die Quarzmikrowaage (QCM) oder die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) einen wichtigen Beitrag leisten. Diese sind in der Lage, Auskunft über die Bindungsaffinität und Membraninteraktion der Antibiotika zu geben. Der Einsatz von Biosensoren und Modellmembranen zur Simulation der antimikrobiellen Wirkung kann als analytische Methode verwendet werden, um die Wechselwirkung von potentiellen Antibiotika an Zielstrukturen zu testen und Aussagen zu treffen, welchen Einfluss Modifikationen an der Struktur auf die Bindung haben.

Daher ist vor allem die Grundlagenforschung im Bereich der Wirkmechanismen essenziell, um neue Arzneimittel zu entwickeln oder bestehende Strukturen zu verbessern mit dem Ziel, die bestmöglichen therapeutischen Ergebnisse zu erreichen.

Im Fokus dieser Dissertation stehen Peptidantibiotika, deren Zielstruktur die Zellwand oder Zellmembran darstellen.

Am Beispiel des Lantibiotikums Gallidermin soll aufgezeigt werden, welchen Einfluss die Membranwechselwirkung, als zusätzliche Komponente des molekularen Mechanismus, auf die Gesamtwirksamkeit ausübt. Der direkte Vergleich unter den Glykopeptidantibiotika Vancomycin und Telavancin soll verdeutlichen, wie eine strukturelle Veränderung einen zusätzlichen antimikrobiellen Effekt verursacht. Die Lipopeptide Friulimicin und Daptomycin dienen als Beispiel für die Calcium-Abhängigkeit der Bindung dieser Antibiotika.

Mit Hilfe der Biosensortechniken sollen unspezifische Membranwechselwirkungen quantifiziert und von targetabhängigen Mechanismen abgegrenzt werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Biosensoren

Biosensoren sind nach IUPAC Vorrichtungen, die chemische Verbindungen über spezifische biochemische Prozesse erkennen und die dabei erzeugten Messgrößen in ein elektrochemisches, thermisches oder optisches Signal umwandeln [4]. Im Prinzip bestehen Biosensoren aus einem Biorezeptor, welcher ein biologisches Erkennungselement darstellt und einem Wandler (engl. „transducer“). Der Biorezeptor erkennt den zu untersuchenden Analyten anhand der ablaufenden biochemischen Reaktion. Die erhaltene Information wird durch den Wandler in ein physikalisch messbares Signal umgewandelt:

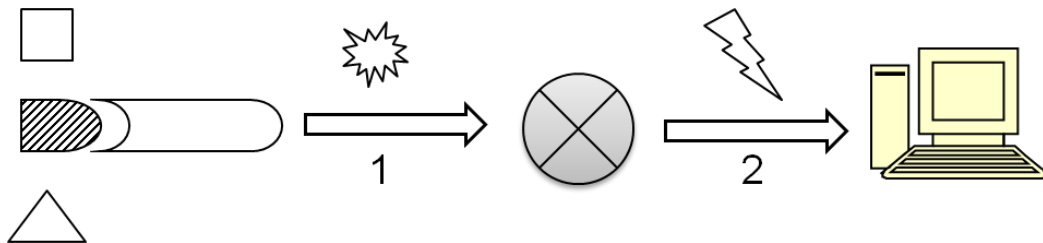


Abbildung 1: Funktionsweise eines Biosensors: 1.) Spezifische molekulare Erkennung des Analyten durch den Biorezeptor. 2.) Messung und Ausgabe der Information durch den Wandler.

Beide Bestandteile eines Biosensors bilden dabei eine bauliche Einheit. Der Biorezeptor muss spezifisch auf die zu messende biochemische Reaktion reagieren. Somit ist auch in Gegenwart von Begleitsubstanzen eine störungsfreie Erkennung gewährleistet.

Die Detektion durch den Wandler kann durch unterschiedlichste physikalische Verfahren erreicht werden. Eine Übersicht gängiger Biosensorkombinationen liefert die folgende Abbildung:

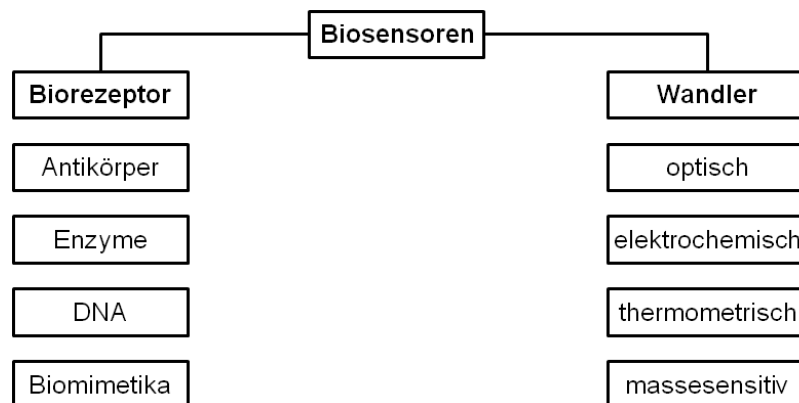


Abbildung 2: Einteilung der Biosensoren nach Biorezeptor und Wandler.

Als Biorezeptoren werden zumeist Antikörper oder Antigene aufgrund ihrer sehr hohen Spezifität eingesetzt. So haben Campbell et al. Antikörper verwendet, um ganze Blutzellen zu erfassen [5]. Polster et al. haben das Enzym Penicillinase zusammen mit dem pH-Indikator Phenolrot auf Glasfasern immobilisiert und damit Penicillin und Ampicillin durch pH-Wert Änderungen während der Hydrolyse simultan bestimmt [6]. Selbst DNA-Fragmente wurden irreversibel auf einer Sensoroberfläche immobilisiert und die Echtzeitbindung von Liganden mit der Surface-Plasmon-Resonanz-Methode verfolgt [7]. Des Weiteren finden auch Rezeptoren und sogar ganze Zellen Verwendung [5]. In der vorliegenden Arbeit erfüllen Phospholipid-Modellmembranen, die zur Simulierung bakterieller Zellmembranen eingesetzt werden und auf Quarzsensoroberflächen immobilisiert vorliegen, die Rolle der Biorezeptoren.

Als Wandler fungieren diverse physikalische Messmethoden. Zu den optischen Wandlern gehören Geräte, die die Absorption von Lichtstrahlung, die Fluoreszenz oder wie bei der Surface Plasmon Resonanz-Methode den Brechungsindex messen. Neben den optischen Detektionsmethoden sind elektrochemische Wandler sehr häufig im Gebrauch. Meist handelt es sich dabei um Metallelektroden in Kombination mit Bezugselektroden. Gemessen werden die Potentialdifferenz zwischen einer Arbeits- und einer Referenzelektrode (Potentiometrie), der entstehende Stromfluss bei konstanter Spannung (Amperometrie) und die elektrische Leitfähigkeit zwischen zwei Platinelektroden (Konduktometrie) [8].

Biosensoren finden heutzutage Einsatz in der Medizin, der Toxikologie und der chemischen Industrie. Ein großer Vorteil der Biosensoren liegt in den geringen Materialkosten und der Miniaturisierung des Versuchsansatzes. Somit wird der Substanzbedarf verringert und die Messzeit verkürzt [9]. Einer der ersten verwendeten Biosensoren ist der Glucose-Sensor zur Bestimmung des Glucosegehaltes im Blut, der 1962 von Clark und Lyons entwickelt wurde. Der Biosensor besteht aus dem Enzym Glucose-Oxidase als Biorezeptor, welches zwischen zwei Membranen aufgebracht ist, und einer Sauerstoffelektrode als amperometrischer Wandler. Die Glucosekonzentration wird als Änderung der Sauerstoffkonzentration infolge der Oxidation der Glucose unter katalytischer Wirkung des Enzyms Glucose-Oxidase bestimmt [10]. Mittlerweile sind kommerzielle Blutzuckermessgeräte auf dem Markt, die sehr geringe Probenvolumina (0.5 μ L) und kurze Messzeiten (5 sec) benötigen.

Zunehmende Bedeutung haben in letzter Zeit massesensitive Biosensoren gewonnen, deren bekannteste Vertreter, die Quarzmikrowaage (QCM) und der akustische Oberflächenwellensensor (SAW) im Folgenden näher vorgestellt werden sollen. Die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) zählt nach der gängigen IUPAC-Definition nicht zu den Biosensoren im engeren Sinn, eignet sich aber aufgrund der thermischen Detektion hervorragend als Wandlerelement.

2.1.1. Quarzmikrowaage

Die Quarzmikrowaage (engl. „**Q**uartz **C**rystal **M**icrobalance“) ist der prominenteste Vertreter der massesensitiven Biosensoren, deren Messtechnik auf dem inversen piezoelektrischen Effekt von Quarzkristallen beruht. Der Piezoeffekt, der erstmals 1880 von den Gebrüdern Curie bei Untersuchungen an Turmalinkristallen entdeckt wurde [11], basiert auf dem Phänomen des Auftretens elektrischer Ladungen bei der mechanischen Verformung bestimmter Materialien. Die entstehende elektrische Spannung, die durch Änderungen der Dipolmomente einzelner Elementarzellen hervorgerufen wird, ist messbar. Umgekehrt kann auch durch Anlegen einer elektrischen Spannung das Material verformt werden. In diesem Fall handelt es sich um den inversen piezoelektrischen Effekt. Dieser wurde 1881 von Gabriel Lippmann beobachtet und gemeinsam mit den Curie-Brüdern experimentell bestätigt [12]. Der Piezoeffekt tritt bei Materialien auf, deren Kristalle kein Inversionszentren aufweisen [13]. Dazu gehören z.B. Quarzkristalle, die aus Siliziumdioxid bestehen. Weitere piezoelektrische Materialien sind z.B. Bariumtitanat oder Lithiumtantalat.

Wird mit Hilfe einer Wechselspannung eine Frequenz an die Elektroden eines AT-Cut-Quarzkristalls (Schnittwinkel $35^{\circ} 10'$ zur optischen Achse) angelegt, die seiner Eigenfrequenz entspricht, so kommt es zu einer mechanischen Oszillation im Quarz, die als Dickenschersschwingung (engl. „**T**hickness **S**hear **M**ode“) bezeichnet wird [13-15]. Dabei bewegt sich die erzeugte Welle lateral zur Oberfläche des Quarzes bei einer senkrechten Eindringtiefe von ca. 250 nm [14]. Jede gebundene Masse auf der Oberfläche des Quarzes wird daher mit der gleichen lateralen Verschiebung und Frequenz des Quarzes mitschwingen.

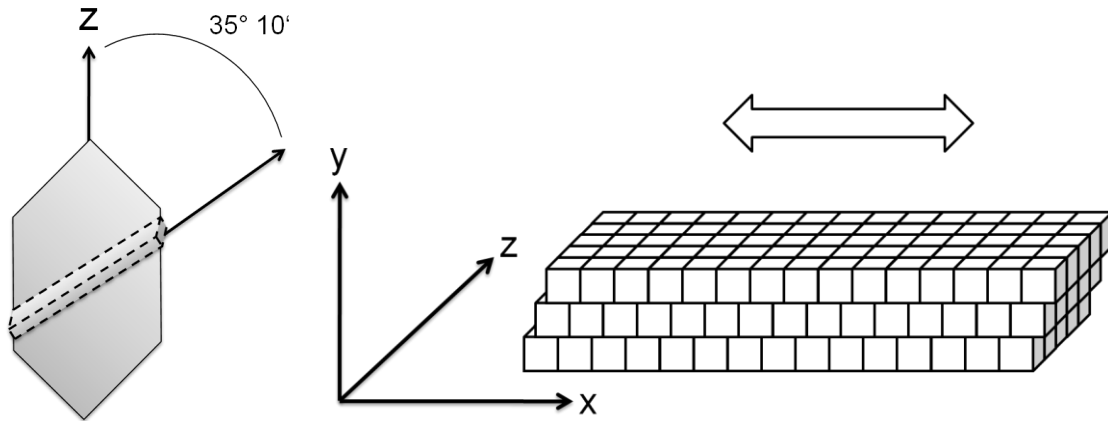


Abbildung 3: AT-Schnittwinkel eines Quarzes (links) und Dickenscherschwingung eines AT-Quarzes nach Anlegen einer Wechsellspannung (rechts).

Die Ausbreitungsgeschwindigkeit der oszillierenden Welle hängt vom Schnittwinkel der Quarzplatte ab. Die Eigenfrequenz ist auch von der Dicke des Quarzkristalls abhängig. Je dünner das Material ist, desto höher werden die Eigenfrequenz und damit auch die Empfindlichkeit der Messung. Die Eigenfrequenz des Quarzkristalls ergibt sich aus folgender Gleichung:

$$f = \frac{v}{2 \cdot d} \quad d = \frac{m}{F \cdot \rho} \quad (1)$$

f	Eigenfrequenz
v	Ausbreitungsgeschwindigkeit der Transversalwelle
d	Plattendicke
m	Masse
F	Fläche
ρ	Dichte

Im Jahre 1959 erkannte der deutsche Physiker Günter Sauerbrey als Erster den linearen Zusammenhang zwischen der Änderung der Resonanzfrequenz f und der Auflagerung von Massen auf einer Quarzoberfläche [16]. Mit Hilfe der Frequenzänderung der Quarzschwingung kann die Masse somit indirekt „gewogen“ werden:

$$\frac{\Delta f}{f} = -\frac{\Delta d}{d} = -\frac{\Delta m Q}{\rho Q \cdot F \cdot d} = -\frac{\Delta m}{\rho Q \cdot F \cdot d} \quad (2)$$

f	Eigenfrequenz des Quarzes
d	Dicke des Quarzes
ρQ	Dichte des Quarzes
F	Fläche
$\Delta m Q$	Masse einer Schicht der Dicke Δd
Δm	Masse einer homogenen Schicht

Aus (2) ergibt sich die Eigenfrequenzänderung $\Delta f/f$, wenn die Dicke d eines Quarzes um Δd vergrößert wird. Die Quarzdicke, der Schermodus und die Quarzdichte werden als Konstanten zur Schichtwägeempfindlichkeit C_F zusammengefasst.

Die Massenauflagerung wird demnach formal als Zunahme der Schichtdicke betrachtet:

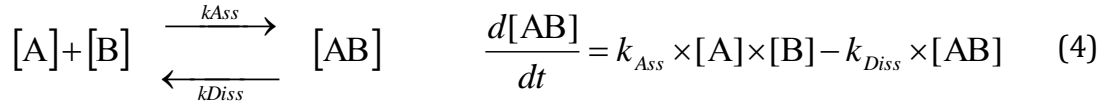
$$\Delta f = -C_F \cdot \Delta m \quad (3)$$

Aus der vereinfachten Form der Sauerbrey-Gleichung (3) ist der lineare Zusammenhang zwischen der Frequenzänderung und der Massenauflagerung auf dem schwingenden Quarz eindeutig erkennbar. Bindungen an Modellmembranen, die auf einer Quarzoberfläche immobilisiert sind, führen aufgrund der Zunahme der Schichtdicke zwangsläufig zu einer Frequenzabnahme. Streng genommen gilt die Sauerbrey Gleichung nur für kleine elastisch gebundene Massen, deren Eigengewicht maximal 2% des Quarzgewichts haben dürfen [14].

Da die Umgebungstemperatur ebenfalls einen Einfluss auf die Frequenzmessung hat, sollte die Messung unter konstanten Temperaturbedingungen durchgeführt werden. Die Empfindlichkeit der QCM reicht in den ng-Bereich: Bei einem Quarz mit einer Resonanzfrequenz von 9 MHz entspricht eine Frequenzänderung von einem Hertz einer Masse von 1.11 ng [14]. Da anhand der Frequenzänderung auf die Masse zurückgeschlossen werden kann, ist die QCM somit theoretisch zur Wägung von Substanzen im Nanogramm-Bereich geeignet.

Die Gleichungen (2) und (3) gelten streng genommen nur für Messungen an der Luft. Daher wurden basierend auf der Sauerbrey-Gleichung durch Kanazawa und Gordon Modifizierungen vorgenommen, um die Bedingungen bei Messungen in Newtonschen Flüssigkeiten genauer zu beschreiben [17]. Berücksichtigt werden dabei Faktoren wie Dichte und Viskosität. Die viskoelastischen Eigenschaften der immobilisierten Schichten und der gebundenen Substanzen werden durch Messung der Dämpfung erfasst. Diese zusätzlich aufgezeichneten Werte geben Hinweise auf die Art der Bindung und Konformationsänderungen der Moleküle auf der Quarz-oberfläche. Bestimmt wird der Energieverlust, den der schwingende Quarz durch die aufgelagerte Masse erfährt. Hierbei ist die Schwingungsänderung bei Vesikeln größer als bei starren Strukturen. Grund hierfür ist die Aufnahme der Schwingungsenergie durch die äußere Gestalt der voluminösen Stoffe.

Neben der Messung der Frequenz- und Dämpfungsänderung kann aus dem Frequenzverlauf auch die Bindungskinetik berechnet werden. Dabei geht man von einem Kinetikmodell zweiter Ordnung aus [18]. Das Peptid [A] bindet dabei an die immobilisierte Membran [B] und bildet einen reversiblen Komplex [AB]:



Da die Konzentration des zugesetzten Peptids [A] während der Zugabe unter Flussbedingungen nahezu konstant ist und damit von der Konzentration der Membran abhängt, kann die Reaktion mit einer Kinetik pseudo-erster Ordnung beschrieben werden.

$$\frac{d[AB]}{dt} = k' \times [B] - k_{Diss} \times [AB] \quad [B] = [B_0] - [AB] \quad (5)$$

Die Konzentration des Peptid-Membrankomplexes wird durch die Änderung der Frequenz detektiert. Somit entspricht die Frequenzänderung Δf der Konzentration des Komplexes [AB]. Die Dissoziation ist unabhängig von der Konzentration und kann durch die Frequenz bestimmt werden.

$$\frac{\Delta f}{\Delta t} = k_{Ass} \times [A] \times (f_{\max} - f) - k_{Diss} \times f \quad \frac{\Delta f}{\Delta t} = -k_{Diss} \times f \quad (6)$$

Die Größe f_{\max} aus (7) gibt die maximale Frequenzabnahme wieder.

Mit Hilfe nichtlinearer Regressionsrechnung kann aus dem aufsteigenden Kurvenast die Dissoziation und aus dem vorherigen Frequenzabfall die Assoziation ermittelt werden (Abb. 4). Durch Integration der Gleichungen (6) erhält man die Assoziationskonstante k_{Ass} (7) und die Dissoziationskonstante k_{Diss} (8):

$$k_{Ass} : \Delta f = \frac{k_{Ass} \times [A] \times f_{\max}}{k_{Ass} \times [A] + k_{Diss}} \times (1 - e^{-(k_{Ass} \times [A] + k_{Diss} \times (t-t_0))}) \quad (7)$$

$$k_{Diss} : \Delta f = \Delta f_0 \times e^{-(k_{Diss} \times (t-t_0))} \quad (8)$$

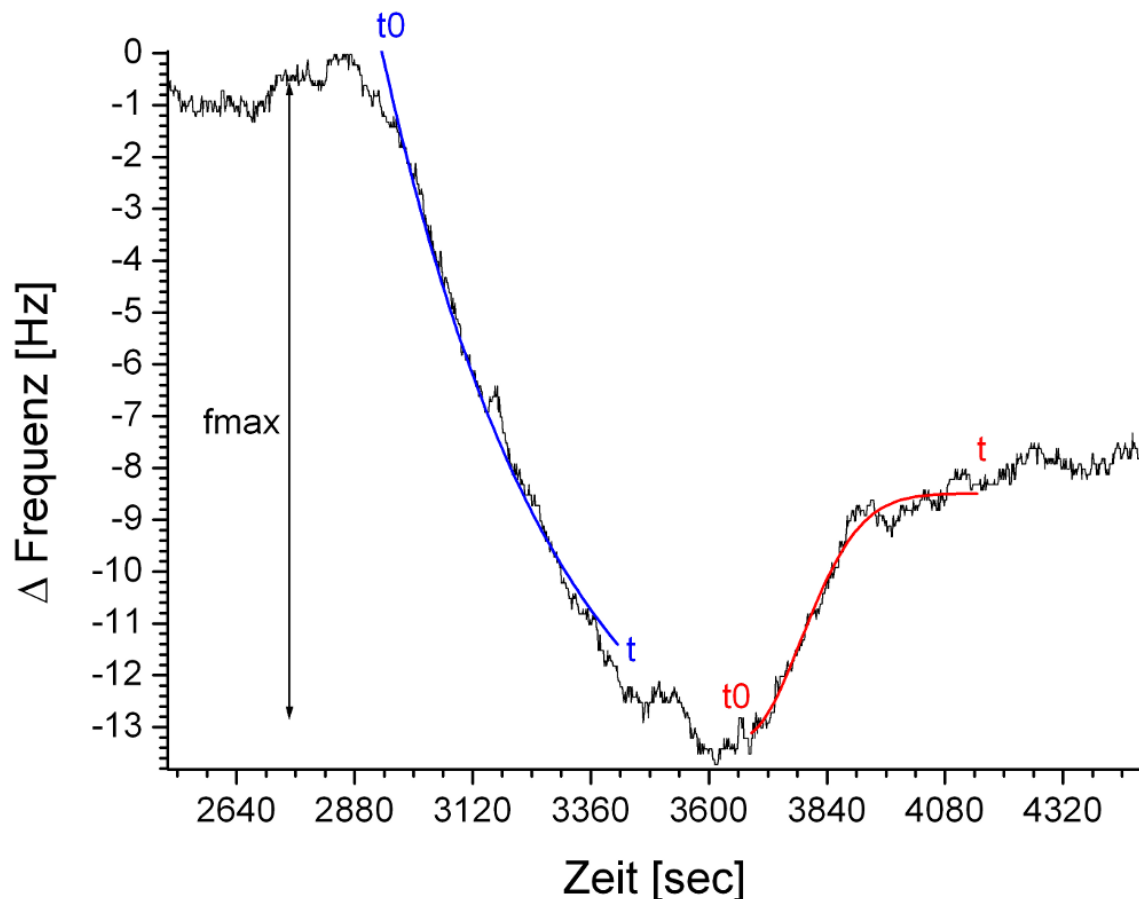


Abbildung 4: Frequenzverlauf einer QCM-Messung. Die Assoziation (blaue Linie) und die Dissoziation (rote Linie) werden durch nicht-lineare Kurvenanpassung berechnet und liefern den K_D -Wert. Die jeweiligen Zeitpunkte t und t_0 sowie f_{\max} werden in die Berechnung einbezogen.

Der K_D -Wert wird aus dem Quotienten k_{Diss}/k_{Ass} berechnet und gibt Auskunft über die Affinität der Peptidbindung an die Modellmembran.

Heutzutage hat die QCM ein breites Anwendungsgebiet. Bis in die 70er Jahre wurde fast ausschließlich in der Gasphase gemessen. Mit der Entwicklung geeigneter Oszillatorschaltungen konnten neben den reinen Frequenzänderungen auch die Dämpfung erfasst werden [13]. So war es dann möglich relevante biologische Fragestellungen zu untersuchen, die unter flüssiger Umgebung durchgeführt werden mussten. Beispielsweise konnten spezifische und unspezifische Adsorptionen von Molekülen an simulierten Membranen analysiert werden. Vaughan et al. haben eine Methode entwickelt, Antikörper kovalent auf der Oberfläche von Quarzkristallen zu immobilisieren und die Bindung mit Antigenen in Echtzeit zu verfolgen [19]. Außerdem können Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, wie z.B. die Bindung von Heparinen an Selektinen untersucht werden [20]. DNA-Hybridisierungen sind dabei ebenso möglich wie die Immobilisierung und Betrachtung ganzer Zellen [14]. Auf

dem Gebiet der Peptid-Membran-Wechselwirkungen wurden von Christ et al. Untersuchungen zur Bindung des Peptidantibiotikums Nisin durchgeführt [21]. Da keine zusätzlichen Marker benötigt werden, eignet sich die QCM für eine breite Palette von Bindungsstudien. Weil zusätzlich kinetische Parameter wie k_{Ass} und k_{Diss} aus dem Frequenz-Zeit-Verlauf berechnet werden können, liefert die QCM im Gegensatz zu ELISA-Methoden weitere wichtige Aussagen über den Bindungsprozess.

2.1.2. Akustischer Oberflächenwellensensor

Eine akustische Oberflächenwelle (engl. „**S**urface **A**coustic **W**ave“) ist eine akustische, mechanische Welle, deren Verbreitung auf die Oberfläche von geschnittenen piezoelektrischen Kristallen begrenzt ist [22]. Der Piezoeffekt wurde durch die Eigenschaften der akustischen Oberflächenpropagation von John William Strutt, dem späteren Lord Rayleigh, weiter ausgeführt [23]. In SAW-Geräten werden mit Hilfe von IDTs (engl. „**I**nter**d**igital **T**ransducer“) akustische Wellen als polarisierbare Transversalwellen durch ein elektrisches Signal generiert [24]. Die erzeugten Wellen wandern über die sensitive Fläche und werden dabei durch biochemische Reaktionen an der Sensoroberfläche in ihrer Charakteristik verändert. Nachher wird die Welle über ein weiteres IDT zurück in ein elektrisches Signal umgewandelt und die Frequenz bzw. Phasenverschiebung kann dann detektiert [24] und mit der korrespondierenden Masse korreliert werden [22]. In diesem Fall ist die akustische Energie stark begrenzt auf der Oberfläche im Bereich der akustischen Wellenlänge und ist unabhängig von der Dicke des gesamten Substrats [24]. Typischerweise ist die Verbreitung der Welle auf eine Führungsschicht unterhalb der Oberfläche des Sensors limitiert. Aus diesem Grund ist die Welle potentiell sehr sensitiv gegenüber jeglicher Veränderung auf der Oberfläche, wie z.B. Massenbeladung und Viskositätsänderungen [22,24]. Das SAW ist somit ein weiterer massesensitiver Biosensor. Im Unterschied zur QCM, die im TSM-Modus operiert und Resonanzfrequenzen zwischen 10 und 50 MHz erreicht, arbeiten SAW-Sensoren in einem Frequenzbereich zwischen 25 und 500 MHz. Die SAW-Sensoren werden üblicherweise durch Lithographie und gezielte Metallabsonderung auf einem gewünschten Substrat hergestellt [24]. Bei der SAW werden Quarzkristalle im ST-Cut verwendet. Die Wahl dieses Schnittwinkels (42.75°) hat Auswirkungen auf die Ausbreitung der erzeugten Welle.

Es werden drei Arten von SAW-Wellen unterschieden. Dabei handelt es sich um Rayleigh-, Lamb- und Love-Wellen [22].

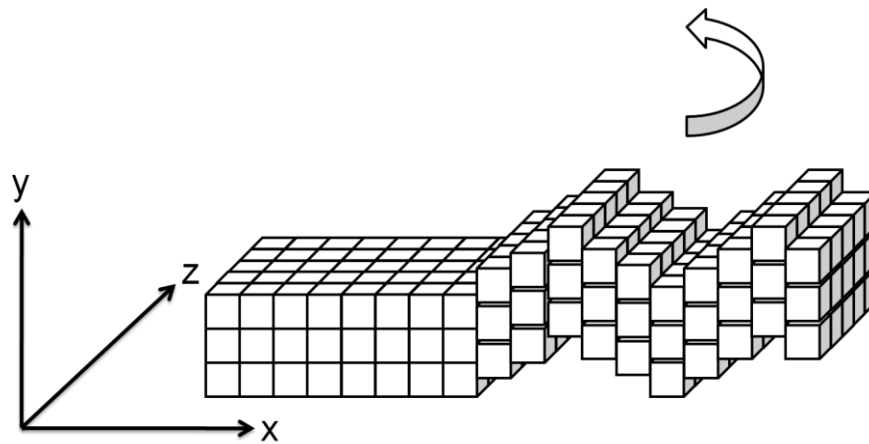


Abbildung 5: Rayleigh Wellenausbreitung in Richtung der y-Achse.

Rayleigh- und Lamb-Wellen breiten sich in Richtung des Mediums aus. Durch hohe Energieverluste können Rayleigh Wellen nur in der Gasphase angewendet werden. Lamb-Wellen erleiden keine Energieverluste und können neben der Gasphase auch in flüssigen Medien eingesetzt werden. Jedoch ist die Geschwindigkeit der Welle abhängig von der Dicke des Sensors und erfordert sehr dünne Scheiben mit wenigen μm , die schwer handhabbar sind und nicht die erforderliche Stabilität für mehrere Messungen aufweisen [25]. Durch die Entwicklung neuer horizontal polarisierbarer Scherwellen, die auf der Love-Welle basieren, konnte der Verlust der akustischen Wellenpropagation in die Bulk- oder Liquidphase verringert werden. Die akustische Oberflächenwelle breitet sich nur in einer dünnen Führungsschicht aus [24]. Damit zählen die Love-Wellen zu den derzeit empfindlichsten akustischen Sensoren.

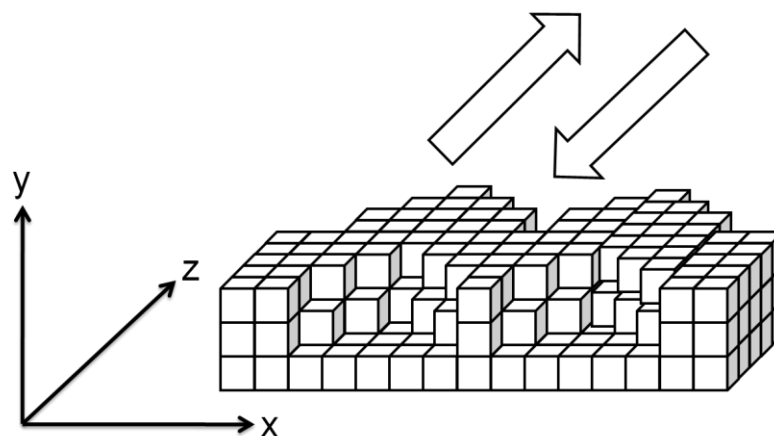


Abbildung 6: Love-Wellenpropagation entlang der z-Achse.

Diese Form der Wellencharakteristik wurde 1913 von dem britischen Mathematiker Love erstmals in Bezug auf seismologische Phänomene bei Erdbeben beschrieben [26]. Durch Love-Wellensensoren wurde es nun möglich gewesen sensitive Messungen in flüssiger Umgebung durchzuführen. Problematisch war allerdings der Umstand, dass bis dahin Aluminium als gängiges IDT-Material eingesetzt wurde und korrosive Schäden an den IDTs schon nach wenigen Stunden sichtbar waren. Man entschied sich dann für ein edles, leitendes Metall wie Gold als IDT und konnte somit einerseits die Korrosion verhindern, andererseits hatte man die Option die Goldoberfläche mit thiolhaltigen Strukturen zu funktionalisieren. Aber auch an Siliziumdioxid als Oberfläche sind Kopplungen durch Silanisierung möglich. Die Wahl der Oberflächenmodifikation eröffnet der SAW als Biosensor viele unterschiedliche Fragestellungen zu untersuchen ohne dabei die Detektion zu beeinträchtigen.

SAW-Messgeräte sind aufgrund der akustischen Verzögerungsstrecke des Messsignals nicht in der Lage die Frequenz zu detektieren. Im Love-Modus weist die SAW zur Ausführung der typischen Wellencharakteristik eine Führungsschicht definierter Dicke auf. Um den Verlust des Frequenzsignals zu minimieren, wird die Phasenverschiebung der Love-Welle infolge der Massenauflagerung registriert.

Da auch der Verlauf der Massenanlagerung betrachtet werden kann, ist es ähnlich wie bei der QCM auch mit der SAW möglich Bindungskinetiken zu messen. Zur Verfügung stehen folgende drei Modelle, die im Einzelnen näher vorgestellt werden. Dabei hängt die Auswahl der Kinetikberechnung von dem Messergebnis und der eingestellten Messparameter ab.

Die Einpunktmessung erlaubt die Berechnung des K_D -Wertes aus einem einzigen Messsignal (9). Dementsprechend ist das Ergebnis sehr fehleranfällig gegenüber Ausreißern. Daher ist eine mehrfache Wiederholung der Messung unter gleichen Bedingungen anzustreben.

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad k_{off} = \frac{1}{t_1} \quad k_{on} = \frac{(k_{obs} - k_{off})}{c} \quad (9)$$

Genauer ist die Kinetikberechnung mit dem Scatchard-Plot, wofür mehrere Einpunktmessungen bei unterschiedlichen Konzentrationen herangezogen werden.

In diesem Fall geht man direkt von der maximalen Phasenverschiebung aus und erstellt ein Diagramm $\Delta\varphi/c$ gegen $\Delta\varphi$. Man erhält eine Gerade, deren reziproke Steigung direkt den K_D -Wert angibt (Abb. 7).

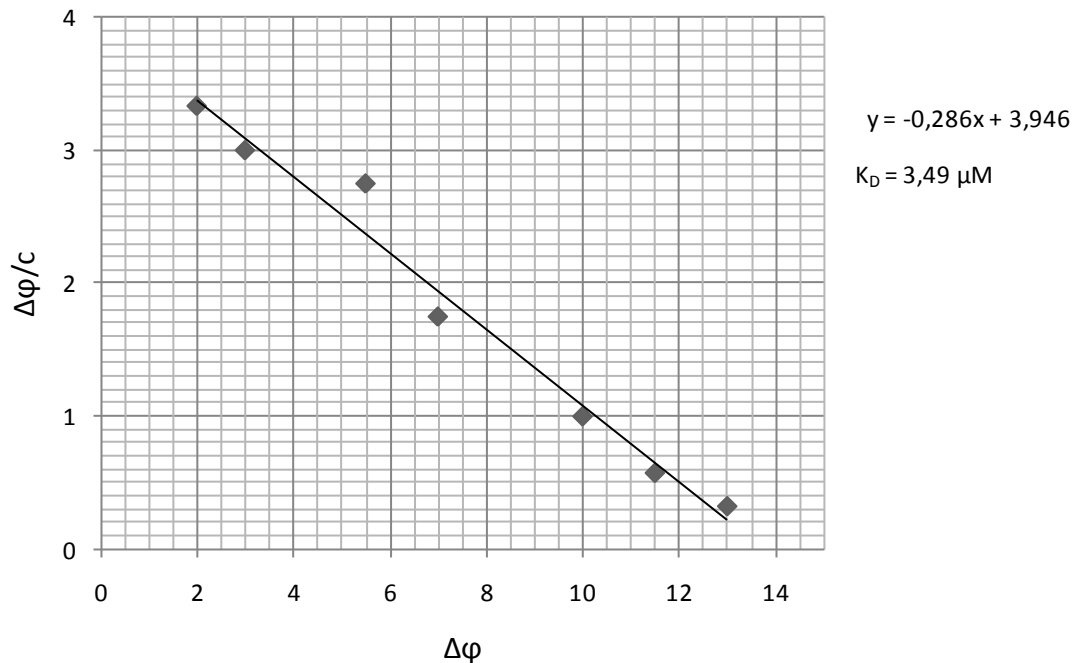


Abbildung 7: Scatchard-Plot einer Messung bei unterschiedlichen Konzentrationen. Der reziproke Wert der Steigung ergibt den K_D -Wert.

Eine weitere Methode kann durch nichtlineare Regressionsrechnung bewerkstelligt werden. Man geht ähnlich wie bei der Kinetikberechnung der QCM von einem Bindungsmodell pseudo-erster Ordnung aus.

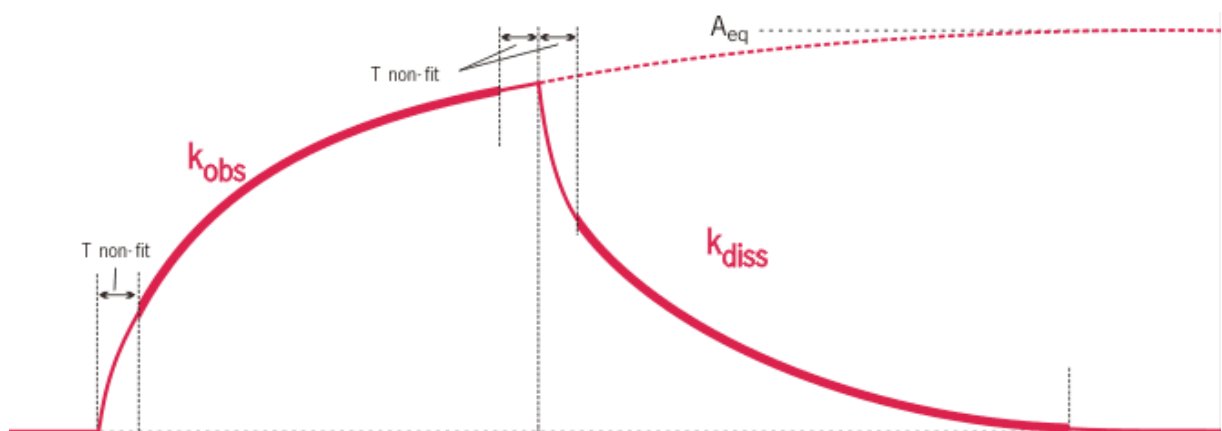


Abbildung 8: Kinetik-Modell nach nichtlinearer Regression durch den Fitmaster in Origin. K_{obs} ist die Assoziation, die für die eingesetzte Konzentration gilt. k_{diss} ist unabhängig von der Konzentration. A_{eq} beschreibt die Assoziation bei vollständiger Bindung.

Vermessen wird in der Regel eine steigende Konzentrationsreihe des Analyten. Dieser Schritt ist notwendig, um k_{obs} in k_{on} zu transformieren und die Assoziation und Dissoziation aus einer Geradengleichung zu ermitteln, bei der die erhaltenen Werte für k_{obs} gegen die entsprechenden Konzentrationen des Analyten aufgetragen werden (10).

$$K_D = \frac{k_{off}}{k_{on}} \quad k_{obs} = k_{on} \times [A] + k_{off} \quad (10)$$

Aus dem y-Achsenabschnitt kann k_{off} abgelesen werden. Die Steigung der Geraden liefert k_{on} . Der Wert für k_{off} entspricht k_{Dis} und wird nur der Übersichtlichkeit halber und zur Abgrenzung von den QCM-Kinetiken hier anders benannt.

Der erste Love-Wellen Biosensorversuch wurde 1992 von Gizeli et al. vorgestellt. IgG wurde auf einer Polymethylmethacrylat Filmschicht immobilisiert und anti-IgG und Protein A wurden als Analyten zugegeben [27]. Harding et al. untersuchten die gleiche Reaktion. Allerdings auf einer reinen SiO₂ Oberfläche [28]. Schlensog et al. arbeiteten an einem SAW mit SiO₂ und einem dünnen Goldfilm, auf dem ein Alkanthiol als SAM immobilisiert wurde. Thrombin-DNA-Aptamere konnten so auf der Sensoroberfläche gekoppelt werden, um Thrombin zu detektieren [29]. Unspezifische Anlagerungen an die Sensoroberfläche konnten durch intermediäre Hydrogelschichten verhindert werden. Ein weiterer Vorteil dieser Schichten bestand darin, dass z.B. Antikörper in diesen Schichten ihre Funktionalität behalten [30]. Bei einem weiteren Versuch von Gizeli und Mitarbeitern wurde eine Alkanthiolschicht auf der Goldoberfläche eines SiO₂-Quarzes ausgerichtet und biotinylierte Phospholipidvesikel inkubiert. Dabei formte sich ein Lipidbilayer. Durch die Zugabe von IgG-verknüpftem Streptavidin wurden die Antikörper ebenfalls auf der Oberfläche immobilisiert und die Bindung von Antigenen gemessen [31]. Gronewold et al. haben über einen Dextranlayer Oligonucleotide immobilisiert und Mutationen über Dissoziationskonstanten der Mutanten an diesen Komplexen identifiziert [32]. Auch die Immobilisation von Enzymen, wie der Glucose-Oxidase wurden durchgeführt [33].

Der Nutzen von SAW-Biosensoren auf dem Gebiet der Peptid-Membran-Wechselwirkungen wurde von Andrä et al. eindrucksvoll demonstriert [34].

Verwendet wurde ein mit 11-Mercaptoundecanol behandelter SAW-Quarz, der zusätzlich mit einer kovalenten Carboxymethyldextranschicht versehen wurde. Die Sensoroberfläche wurde durch Poly-L-Lysin Injektionen positiv geladen. Unilamellare Vesikel aus Phosphatidylserin wurden an dieser Sensoroberfläche immobilisiert und die Bindung des antibiotischen Peptids LL-32 vermessen. Die Peptid-Membran Interaktion führte zu einem positivem Phasen-Shift und einer Zunahme in der Amplitude, womit ein Massenzuwachs mit einem Verlust an Viskoelastizität gezeigt werden konnte.

Der große Vorteil der SAW-Technik liegt zweifellos in der Kombination günstiger Elektronik verbunden mit einem Maximum an Sensitivität ohne zusätzliche Markierung der eingesetzten Analyten [24]. Anderen Messmethoden wie der SPR (engl. Surface Plasmon Resonance) ist die SAW durch zusätzliche Erfassung der Dichte und Viskosität überlegen, da die SPR durch Messung des Brechungsindex nur die Massenauflagerung erfasst. Die Oberfläche der Sensoren ist bei SPR auf edle Metalle beschränkt (meist Gold). Außerdem wird der Brechungsindex leicht durch physikalische Nebeneffekte, wie Pufferveränderungen beeinflusst [22].

Der SAW-Biosensor ist ein universelles Messgerät, das sensitiv Wechselwirkungen zwischen immobilisierten Modellmembranen und Peptidantibiotika detektieren und wertvolle Hinweise über molekulare Wirkmechanismen liefern kann.

2.1.3. Zyklische Voltammetrie

Die Voltammetrie umfasst eine Anzahl elektroanalytischer Methoden, bei denen die Information über den Analyten aus der Messung der Stromstärke in Abhängigkeit von der angelegten Spannung erhalten wird [35].

In der Voltammetrie wird in der Regel mit einem Drei-Elektroden-System gearbeitet. Alle drei Elektroden stehen dabei in Kontakt mit dem Analyten bzw. der Elektrolytlösung. Eine der drei Elektroden ist die Arbeitselektrode, deren Potential linear mit der Zeit verändert werden kann. Die zweite Elektrode ist eine Bezugselektrode, deren Potential während der gesamten Messung konstant gehalten wird. Die Aufgabe der dritten Elektrode besteht darin, den Strom von der Spannungsquelle durch die Lösung zur Arbeitselektrode zu leiten und damit den Stromkreis zu schließen. Sie wird als Gegen- oder Zählelektrode bezeichnet [35,36].

Bei der zyklischen Voltammetrie (engl. „Cyclic Voltammetry“) wird der Strom einer kleinen stationären Elektrode in einer ungerührten Lösung durch eine dreieckförmige Steuerspannung erzeugt. Das Potential wird linear von einem Ausgangspotential zu einem Umkehrpotential gefahren. Dann wird die Abtastrichtung umgekehrt und das Potential wieder zum Ausgangswert zurückgefahren. Dieser Zyklus kann beliebig oft wiederholt werden, da vollständig reversible Redoxpaare eingesetzt werden. Der Potentialbereich wird dabei so gewählt, dass Diffusions-kontrollierte Oxidationen und Reduktionen eines redoxaktiven Paares stattfinden können. Der entstehende Faraday'sche Strom kann mit einem Amperemeter gemessen werden [37].

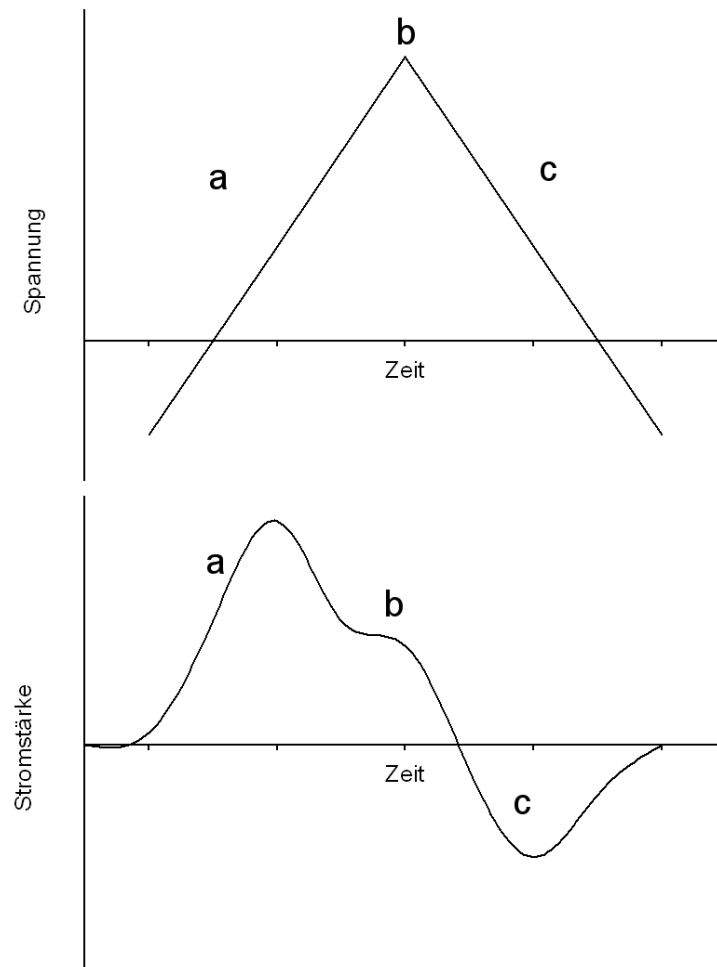


Abbildung 9: Zyklus einer CV-Messung: Darstellung der angelegten dreieckförmigen Steuerspannung, und Verlauf des gemessenen Faraday'schen Stroms in einem Strom-Zeit-Diagramm. Das Potential wird linear bis zu einem festgelegten Wert gefahren (a). Der entstehende kathodische Strom wird gemessen. Nach Umkehr des Potentials (b) werden anodische Ströme registriert (c).

Der Massetransport der Ionen an der Grenzfläche der Elektrode zur Lösung wird durch Konzentrationsunterschiede innerhalb der Ionenlösung verursacht. Die treibende Kraft für den Konzentrationsausgleich ist die Diffusion der Ionen. Bei Anlegen einer Spannung wird ein elektrisches Feld aufgebaut und aufgrund der Polarisierung der Elektroden erfolgt ein gerichteter Transport der Ionen. Dieser als Migration bezeichnete Effekt stört die Diffusion. Man verhindert dies durch Zugabe eines Leitsalzes in hoher Konzentration. Dabei kommt es zum Aufbau einer definierten Doppelschicht und zum Ausgleich von Potentialunterschieden. In einer gerührten Lösung wird der Diffusionsprozess mit dem 1.Fick'schen Gesetz beschrieben:

$$J = -D \cdot A \cdot \left(\frac{\delta c}{\delta x} \right) \quad (11)$$

Der Stofffluss J ist abhängig vom Diffusionskoeffizienten D , der Elektrodenfläche A und direkt proportional zum Konzentrationsgradienten.

$$\left(\frac{\delta c}{\delta x} \right) \approx \frac{C_0 - C_E}{d} \quad (12)$$

Dieser setzt sich aus der Konzentration der Ionen in Lösung C_0 , der Konzentration der Ionen an der Elektrodenoberfläche C_E und der Dicke der Diffusionsschicht d zusammen.

Werden (11) und (12) auf die Voltammetrie angewendet, so kann die Stromstärke I unter Zusatz der Ladungszahl z und der Faradaykonstante F wie folgt berechnet werden [38]:

$$I = -z \cdot F \cdot A \cdot D \cdot \frac{C_0 - C_E}{d} \quad (13)$$

Da CV-Messungen in ungerührten Lösungen durchgeführt werden, gilt in diesem Fall das 2.Fick'sche Gesetz:

$$\frac{\delta c}{\delta t} = D \cdot \left(\frac{\delta^2 c}{\delta x^2} \right) \quad (14)$$

Gleichung (14) beschreibt, wie sich die Konzentration c an einer Stelle x im Lauf der Zeit t ändert. Bei stationären Elektroden ist die Dicke der Diffusionsschicht d näherungsweise eine Funktion der Zeit t . Daraus ergibt sich für die Berechnung des Diffusionsgrenzstroms I_{gr} folgende Gleichung:

$$I_{gr} = -z \cdot F \cdot A \cdot D \cdot \frac{C_0}{\sqrt{\pi \cdot D \cdot t}} \quad (15)$$

Da die Dicke der Diffusionsschicht mit der Zeit zunimmt, verringert sich der Diffusionsgrenzstrom trotz zunehmenden Potentials, was zur typischen Form eines Zyklovoltammogramms führt. In dieser Diagrammform wird die gemessene Stromstärke gegen die angelegte Spannung aufgetragen. In Abb. 10 ist ein solches

Diagramm einer redoxaktiven Substanz am Beispiel des Redoxpaares $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ zu sehen:

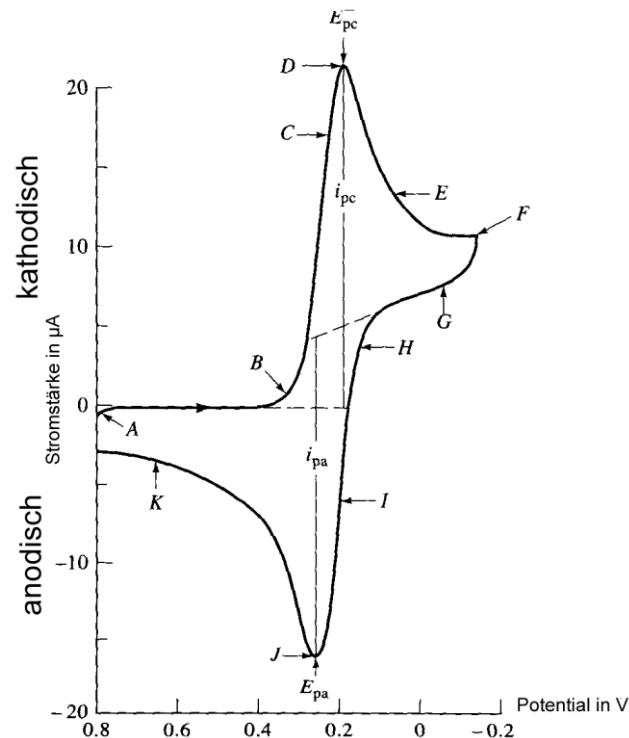


Abbildung 10: Zyklovoltammogramm des Eisen Redoxpaares; modifiziert nach [37]. A: Kapazitiver Stromfluss und Restströme. B: Reduktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} . B-D: Anstieg der Stromstärke, da die Oberflächenkonzentration an Fe^{3+} immer mehr absinkt. D: Kathodisches Spitzenpotential (E_{pc}) und kathodischer Spitzenstrom (i_{pc}). F: Potentialumkehr. E-G: Grenzströme sinken mit Ausbreitung der Nernstschen Diffusionsschicht rasch ab. Der Strom bleibt jedoch kathodisch, weil das Potential ausreichend negativ ist, um Fe^{3+} weiterhin zu reduzieren. H: Wenn die Reduktion bei weiterem Spannungsanstieg nicht mehr länger erfolgen kann, sinkt der Strom auf Null ab. I: Es folgt ein anodischer Strom, der auf Rückoxidation des Fe^{2+} zurückzuführen ist. Dieses hat sich während des Spannungsabfalls an der Elektrodenfläche angereichert. J: Anodisches Spitzenpotential (E_{pa}) und anodischer Spitzenstrom (i_{pa}). K: Strom sinkt ab, wenn das angereicherte Fe^{2+} aufoxidiert wurde [36].

Wichtige Parameter in einem Zyklovoltammogramm sind die kathodischen und anodischen Spitzenpotentiale E_{pc} und E_{pa} sowie die kathodischen und anodischen Spitzenströme i_{pc} und i_{pa} . Sie erlauben Aussagen über die Reversibilität von Redoxreaktionen. So sind bei reversiblen Reaktionen die kathodischen und anodischen Spitzenströme annähernd gleich, und die Differenz der Spitzenpotentiale beträgt demnach 59 mV [36]. Bei nicht-reversiblen Reaktionen ändert sich demzufolge die Lage der Spitzenpotentiale. Aus den Anstiegen der konzentrationsabhängigen Spitzenströme kann auf den Beschichtungsgrad der Arbeitselektrode geschlossen werden. Dabei sinken die Spitzenströme mit zunehmenden Filmschichten infolge der Isolierung der Elektrode ab.

Die zyklische Voltammetrie hat eine große Bedeutung bei der Untersuchung von Reaktionsmechanismen bei Redoxprozessen. Es kann die Gegenwart von Zwischenprodukten in Redoxreaktionen aufgeklärt werden. So wurde bei Untersuchungen des Acetylcholinesterase-Inhibitors Physostigmin die Anwesenheit von Zwischenverbindungen bestätigt [39].

Als Arbeitselektrode kann ein beschichteter CV-Quarzsensoren verwendet werden. Durch die Beschichtung wird die Elektrode isoliert und für die redoxaktiven Teilchen wird eine zusätzliche Diffusionsbarriere geschaffen, die entstehenden Faraday'schen Ströme abschwächt. Wird diese Schicht durch Peptidzugabe zerstört, so kommt es zu einem deutlichen Stromanstieg, da eine höhere Anzahl von Ionen die Arbeitselektrode erreichen kann und dort entsprechend umgesetzt wird.

Die CV kann daher als Biosensor eingesetzt werden, um Permeabilitätsveränderungen von Modellmembranen zu detektieren. Eine Porenbildung ist somit als Änderung der Stromstärke nachweisbar.

So haben Christ et al. die Porenbildungsfähigkeit der Peptidantibiotika Nisin und Gallidermin an Modellmembranen untersucht [40]. Nicht nur die Porenbildung an sich, sondern auch der Grad der Membranpermeabilisierung konnte anhand des Stromstärken- bzw. Ladungsanstiegs nachvollzogen werden.

Ein transformierter CV-Lauf eines Porenbildners ist in Abbildung 11 zu sehen.

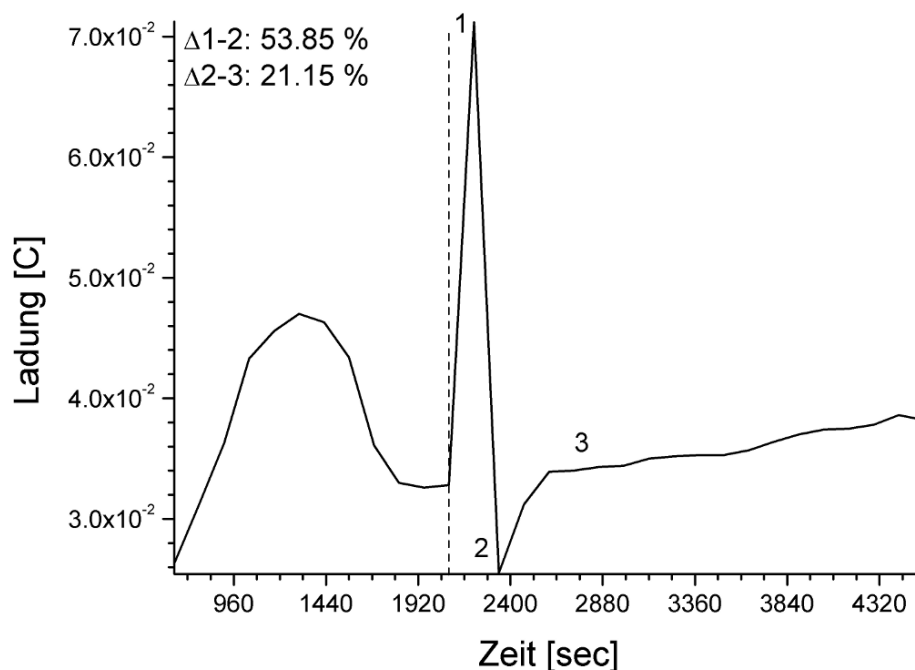


Abbildung 11: Integration eines CV-Laufs. Die Strecke d2-3 gibt den Anstieg der Stromstärke infolge von Porenbildung an der Modellmembran wieder.

Zur vereinfachten Auswertung wird das Integral eines CV-Zyklus herangezogen, da aufgrund der bereits erwähnten Elektrodenisolierung eine genaue Ermittlung der Spitzenströme nicht gewährleistet ist.

$$Q = \int I \cdot t \, dt \quad (16)$$

Als Maß für die Stromstärke wird die Ladung Q als Messgröße herangezogen.

2.1.4. Isotherme Titrationskalorimetrie

Die Thermodynamik, auch als Wärmelehre bezeichnet, ist ein Teilgebiet der klassischen Physik und befasst sich mit der Erforschung der Umwandlung von Energie in Wärme oder andere mechanische Formen, wie Arbeit. Entstanden ist die Thermodynamik im Verlauf des 19. Jahrhunderts durch Arbeiten mehrerer Wissenschaftler wie Joule, Carnot und Helmholtz [41-43]. Dabei lag die Intention der Forschung vornehmlich darin, die physikalischen Eigenschaften eines Systems durch makroskopische Zustandsgrößen, wie Temperatur, Druck und Volumen zu beschreiben. Durch die Betrachtung eines technischen Problems gelang es Nicolas Leonard Sadi Carnot im Jahre 1824 erstmals die damals schon bekannten Phänomene der Energieerzeugung durch Dampfmaschinen wissenschaftlich zu deuten. Dabei erkannte Carnot fundamentale Zusammenhänge, die er im Kreisprozess beschrieb, und die schließlich in den Zweiten Hauptsatz der Thermodynamik mündeten. Damit kann Carnot als Begründer der Thermodynamik angesehen werden. Aufbauend auf den Ergebnissen von Carnot und Joule formulierte Clausius 1850 die beiden Hauptsätze der Thermodynamik. Außerdem wurde der Begriff Entropie als neue Größe eingeführt. Poincare und Planck bauten ihre Neubegründung der Thermodynamik 1888 auf makroskopisch messbare Größen unter Aufgabe der mechanischen Wärmetheorie auf. Im Laufe der Zeit wurde die Thermodynamik von einer reinen Wärmelehre zu einer allgemeinen Energielehre weiterentwickelt, die sich mit Energiebilanzen und Aussagen über unterschiedliche Formen der Energieumwandlung bei technischen Prozessen auseinander setzt [43]. Die Basis der Thermodynamik bilden nach wie vor vier Hauptsätze [41]:

Tabelle 1: Die Hauptsätze der Thermodynamik und ihre Aussagen.

Hauptsatz	Generelle Aussage
0	Rechtfertigt Konzept der Temperatur und damit Funktionsweise eines Thermometers
1	Energieerhaltungssatz
2	Freiwilliger Ablauf von Zustandsänderungen
3	Der absolute Nullpunkt der Temperatur wird nie erreicht

Die Kalorimetrie ist ein Bereich der Wärmelehre, dessen Grundlage der erste Hauptsatz der Thermodynamik darstellt. Der 1. Hauptsatz besagt, dass Energien ineinander umwandelbar sind und die Energie erhalten bleibt. Jedes System besitzt eine innere Energie U .

Diese ist definiert als die Summe von Wärme q und Arbeit w .

$$dU = \delta q + \delta w \quad (17)$$

Die Arbeit kann auch als verrichtete Volumenarbeit $p \cdot dV$ beschrieben werden.

$$dU = q - p \cdot dV \quad (18)$$

Als Maß für die Energie des Systems wird die Enthalpie H herangezogen (19). Die Änderung der Enthalpie dH entspricht somit (20):

$$H = U + p \cdot V \quad (19)$$

$$dH = dU + p \cdot dV + V \cdot dp \quad (20)$$

Fügt man die Gleichung (18) in (20) ein, so erhält man folgenden Ausdruck für die Enthalpieänderung:

$$dH = q + V \cdot dp \quad (21)$$

Befindet sich das System in einem Zustand konstanten Drucks ($dp = 0$), so gilt:

$$dH = q \quad (22)$$

Damit erhält man die Enthalpie des Systems unter isobaren Bedingungen aus der Messung der Wärme.

Nahezu jede chemische Reaktion oder physikalische Vorgang ist durch eine Veränderung der Wärme oder der Enthalpie gekennzeichnet. Es werden abhängig vom Vorgang unterschiedliche Enthalpien definiert, wie z.B. Bindungsenthalpien und Verdampfungsenthalpien. Die Freiwilligkeit von ablaufenden Reaktionen wird im zweiten Hauptsatz der Thermodynamik wiedergegeben. Es existieren also auch Reaktionen, die nicht freiwillig ablaufen werden, da sie eine ungünstige Energiebilanz aufweisen. Bei einer freiwilligen Zustandsänderung nimmt die Entropie eines abgeschlossenen Systems zu.

Die Entropie ist eine Größe, die nicht direkt gemessen werden kann. Die thermodynamische Definition der Entropie S ist der Quotient aus Wärmeänderung dq und absoluter Temperatur T .

$$dS = \frac{dq}{T} \quad (23)$$

Populärwissenschaftlich wird die Entropie häufig als Maß für die Unordnung eines Systems bezeichnet. 1880 definierte Ludwig Boltzmann die Entropie als Wahrscheinlichkeit für die Anzahl der mikroskopisch erreichbaren Zustände W , die unabhängig von einem festgelegten Ordnungsgrad sind. Diese Form der Interpretation beruht auf einer statistischen Betrachtung eines Systems als Verteilung von Energiezuständen [41].

$$S = k \cdot \ln W \quad (24)$$

Helmholtz und Gibbs haben daraufhin die freie Energie A und die freie Enthalpie G beschrieben, um die energetischen Aspekte (innere Energie bzw. Enthalpie) mit der Freiwilligkeit von Reaktionen (Entropie) in einen gemeinsamen Kontext zu bringen. Hergeleitet wurde die freie Enthalpie G (26), die im Zusammenhang mit dem chemischen Potential μ steht (25), aus der Entropieänderung eines Systems α :

$$\mu_i = \mu_o + R \cdot T \cdot \ln \{a_i\} \quad (25)$$

$$G = G_0 + R \cdot T \cdot \ln a \quad (26)$$

Im thermischen Gleichgewicht ist $dG = 0$ und damit wird:

$$\Delta G = -R \cdot T \cdot \ln K \quad (27)$$

Die Gesamt-Entropie eines Systems ΔS_{ges} entspricht der Summe aus innerer ΔS und äußerer Entropie $\Delta S_{au\beta en}$ [42]:

$$\Delta S_{ges} = \Delta S + \Delta S_{au\beta en} \quad (28)$$

$$\Delta S_{au\beta en} = \frac{\Delta q_{au\beta en}}{T} \quad \Delta q_{au\beta en} = -\Delta q \quad (29)$$

$$\Delta S_{ges} = \Delta S - \frac{\Delta q}{T} \quad | \cdot T \quad (30)$$

$$T \cdot \Delta S_{ges} = T \cdot \Delta S - \Delta q \quad \Delta G = -T \cdot \Delta S_{ges} \quad (31)$$

Der Zusammenhang zwischen Bindung und Wärme ergibt sich aus (27) und (31):

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S = -R \cdot T \cdot \ln K \quad (32)$$

Somit erhält man aus kalorimetrischen Messungen neben der Wärme auch Information über die Gleichgewichtskonstante und damit auch über die Bindungsstärke.

Lavoisier und Laplace haben das erste relevante kalorimetrische Experiment im Jahre 1780 durchgeführt. Sie hatten ein Eiskalorimeter gebaut und die metabolische Wärme eines Meerschweinchens über das geschmolzene Wasser ermittelt [44].

Die Titrationskalorimetrie wurde erstmals als eine Methode für die simultane Erfassung von K und ΔH beschrieben [45]; zunächst nur für Säure-Base-Reaktionen. Die erste biologisch relevante Messung von Beaudette und Langerman erfolgte 1978 [46].

Erst 1989 war das erste kommerzielle Titrationskalorimeter für biologische Fragestellungen erhältlich [47].

In der heutigen Zeit gehört die isotherme Titrationskalorimetrie (engl. „Isothermal Titration Calorimetry“) zu den Routine-Methoden bei der Charakterisierung von Bindungsparametern.

Kalorimetrische Messungen können auf drei unterschiedliche Arten durchgeführt werden [48]:

Tabelle 2: Kalorimetrische Messmethoden.

Art	Messgröße
Temperatur	Änderung der Temperatur
Energiekompensation	Änderung der Heizleistung
Wärmeleitfähigkeit	Spannungsänderung

Das einfachste Kalorimeter ist ein Bombenkalorimeter. Die Temperaturänderung eines temperierten Gefäßes wird vor und nach Reaktandzugabe gemessen. Daraus kann dann der Brennwert bestimmt werden.

Das VP-ITC-Messgerät funktioniert nach dem Prinzip der Energiekompensation. Der Aufbau eines VP-ITC wird in Kapitel 3.2.9 genau beschrieben. Das Kalorimeter ist adiabatisch abgeschirmt und besteht aus zwei Zellen, die separat über ein Heizelement verfügen. Die Temperaturdifferenz zwischen den Zellen wird konstant gehalten. Durch Zugabe eines Reaktanden in eine der Zellen kommt es aufgrund von chemischen oder physikalischen Prozessen zu einer Wärmeänderung in der Messzelle. Erhöht sich die Temperatur, so handelt es sich um eine exotherme Reaktion. Die Leistung des Heizelementes der Messzelle wird heruntergefahren, um die Temperaturdifferenz zwischen den Zellen wieder auf den Wert Null zu bringen. Bei einer Temperaturabkühlung in der Messzelle infolge eines endothermen Vorgangs ist eine Erhöhung der Heizung erforderlich.

Die Messgröße in der ITC ist die Änderung der Heizleistung, die erforderlich ist, um die Temperatur zwischen Mess- und Referenzzelle nach Reagenzzugabe konstant zu halten. Ein typisches sigmoides ITC-Thermogramm ist in Abb. 12 zu sehen:

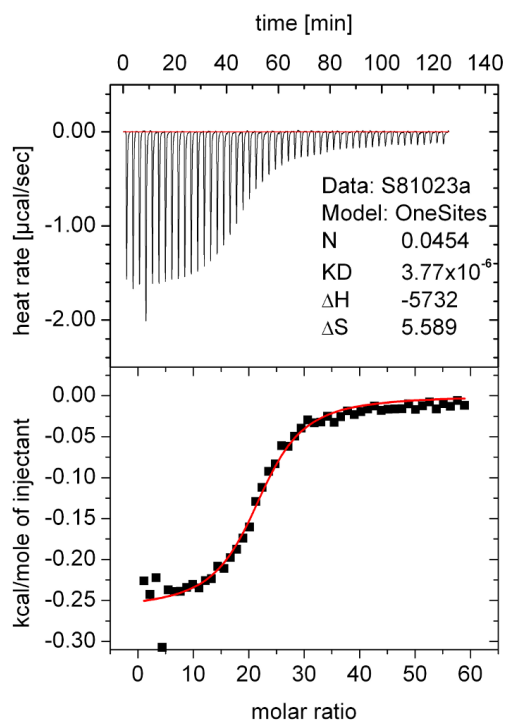


Abbildung 12: ITC-Thermogramm einer exothermen Bindungsreaktion mit 50 Injektionen (oben). Die Integration des ITC-Laufs führt zu einer Bindungsisotherme (unten).

Bei einem ITC-Lauf wird in der Regel die Änderung der Heizleistung in der Einheit $\mu\text{cal/sec}$ gegen die Zeit in min aufgetragen. Jeder Ausschlag der Heizleistung steht für eine Injektion gleichen Volumens in die Messzelle. Die Summe der integrierten Peakflächen gegen die Zeit liefert die totale Wärmemenge q .

Diese Form der Auswertung erlaubt die Ermittlung der Enthalpie ΔH und der Bindungskonstante K_D aus der Bindungsisotherme, sowie die Berechnung der freien Enthalpie ΔG und der Entropie ΔS aus Gleichung (32). Mit diesen Parametern ist eine umfassende thermodynamische Charakterisierung einer Bindungsreaktion möglich.

Die ITC eignet sich für jede Form von Wechselwirkung zwischen zwei Bindungspartnern, bei denen Wärme entweder aufgenommen oder abgegeben wird. Eine Vielzahl von Applikationen ist so realisierbar, wie z.B. Proteininteraktionen mit anderen Proteinen [49], Nukleinsäuren [50], Rezeptoren, Zuckern [51], Antikörpern [52] oder sogenannten small molecules. Aber auch nicht-biologische Fragestellungen, wie die Untersuchung von ionischen, metallischen oder Polymerwechselwirkungen sind ohne weiteres durchführbar. Moderne ITC-Geräte messen Wärmeeffekte, die kleiner als $0.1 \mu\text{cal}$ sind und Bindungskonstanten im Bereich von 10^{-8} bis 10^{-9} mol/L . Im Gegensatz zu optischen Verfahren, können kalorimetrische Messungen auch mit

Reaktanden durchgeführt werden, die kein Chromophor oder gekoppelte Farbstoffe tragen. Selbst trübe Lösungen können in einem weiten pH-Bereich mit unterschiedlicher Pufferzusammensetzung titriert werden [48]. Auch ist eine Immobilisierung eines Messpartners nicht notwendig.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die ITC auf dem Gebiet der Peptid-Lipid-Wechselwirkungen eingesetzt. Dabei wurden Peptide in die Messzellen eingebracht und Lipide als Vesikel über eine Titrationsspritze in Aliquots zugeführt. Auf diese Art und Weise wurden beispielsweise auch die Wechselwirkungen des Peptids Magainin mit Modellmembranen aus POPC/POPG untersucht [53], oder die spezifische Bindung von Cinnamycin mit Phosphatidylethanolaminen [54]. Bringezu et. al haben die Insertion des antimikrobiellen Peptids Dicynthaurin in Modellmembranen verfolgt [55]. Die Bindung von Cathelicidin an Modellmembranen haben Andruschenko und Mitarbeiter gemessen [56]. Binder und Lindblom zeigten mit der ITC die ladungsabhängige Translokation des Peptids Penetratin durch Lipidmembranen [57]. Auch das Lantibiotikum Nisin [58], das Glykopeptidantibiotikum Vancomycin [59] und das kationische Polypeptid Melittin [60] waren schon Gegenstand von ITC-Messungen.

Bei Peptid-Lipid Wechselwirkungen geht man von folgenden Abläufen im wässrigen Milieu aus [61,62]:

Das Peptid besitzt nur eine begrenzte Löslichkeit in Wasser. Die Bindung an die Lipidmembran erfolgt aus dem wässrigen Medium. Der erste Kontakt des Peptids mit dem Lipid ist eine Oberflächenanlagerung, die durch Hydrophobizität, elektrostatische Anziehungskräfte und Wasserstoffbrückenbindungen begünstigt sind. Eine Membraninsertion geht oft mit einer Konformationsänderung des Peptids einher. Je nach Eigenschaft des Peptids kann die Membranordnung gestört oder gar zerstört werden. Eine spezifische Bindung an eine definierte Zielstruktur in der Membran kann ebenfalls erfolgen. Jeder einzelne dieser Vorgänge leistet einen Beitrag zur Wärmeänderung im System, die von der Messsensorik erfasst werden kann.

Abhängig von der Änderung der einzelnen thermodynamischen Parameter werden unterschiedliche Interpretationen über die Wechselwirkung erörtert. Die Enthalpie wird als Maß für die Intensität der Bindung angesehen, während die Entropie Auskunft über mögliche konformationelle Veränderungen gibt. Allerdings sind diese Aussagen stets in Relation zu anderen Wechselwirkungen zu betrachten, so dass die Gesamtheit aus Enthalpie, Entropie und Bindungskonstante eine Übersicht über die thermische Interaktion eines Peptids mit einer Phospholipidmembran gestattet.

Da einige Wechselwirkungen keine sigmoiden Kurvenverläufe zeigen, und die gängige Auswertung über Bindungsisothermen nicht ohne weiteres möglich ist, wurden mathematische Ansätze entwickelt, um diese Problematik zu lösen.

Die Gesamtenthalpie ΔH kann aus der Summe der einzelnen Peakflächen Δh_k und der eingesetzten Peptidstoffmenge n_p ermittelt werden [61]:

$$\Delta H = \sum_1^n \Delta h_k / n_p \quad (33)$$

Die gebundene Fraktion des Peptids X_p am Lipid wird folgendermaßen definiert:

$$X_p^{(k)} = n_p^{(k)} / n_p = \sum_1^k \Delta h_k / \sum_1^n \Delta h_k \quad (34)$$

Die freie Peptidkonzentration c_f für die jeweilige Injektion k unterscheidet sich von der Anfangskonzentration c_0 und wird aus der jeweiligen Peptidfraktion X_p bezogen:

$$c_f^{(k)} = c_0 (1 - X_p^{(k)}) \quad (35)$$

Der molare Anteil des Lipids n_L wird über das Injektionsvolumen V_{inj} und die freie Lipidkonzentration c_L^0 berechnet:

$$n_L^{(k)} = k \cdot V_{inj} \cdot c_L^0 \quad (36)$$

Damit gilt für den Grad der Bindung des Peptids am Lipid:

$$X_b^{(k)} = n_p^{(k)} / (n_L^{(k)} \cdot \gamma) \quad (37)$$

Zu beachten ist hier, dass mit dem Parameter γ der Anteil an Lipid bestimmt wird, der in einem Vesikel für die Bindung eines Peptids auch tatsächlich zugänglich ist.

Man geht von einem Anteil von 50% aus, wenn das Peptid kein Porenbildner ist und nur eine Oberflächenanlagerung bzw. Einlagerung in die Vesikel stattfindet.

Wird der Bindungsgrad X_b gegen die Peptidkonzentration C_f aufgetragen, so erhält man eine Gerade, die als scheinbare Bindungskonstante K_0 bezeichnet wird:

$$X_b = K_0 \cdot C_f \quad (38)$$

In diesem Fall ist die Interaktion des Peptids rein durch hydrophobe Wechselwirkungen zustande gekommen. Liefert die Auftragung eine exponentielle Form, so ist das ein Hinweis auf zusätzliche elektrostatische Kräfte, die an der Bindung beteiligt sind. Damit ist die Konzentration des Peptids in der Nähe der Membran infolge ladungsinduzierter Vorgänge höher als in der Umgebung.

Die Oberflächenkonzentration des Peptids C_M an der Membran kann mit Hilfe der Gouy-Chapman Theorie berechnet werden [63-68]. Dabei gibt es einen Zusammenhang zwischen der Oberflächendichte σ und dem Membranpotential ψ bzw. der Fläche, die polare Lipidbestandteile einer Membran aufweisen. Die Auftragung des Bindungsgrads X_b gegen die Konzentration C_M führt zur linearen apparenten Bindungskonstante K_{ap} [62]:

$$X_b = K_{ap} \cdot C_M \quad (39)$$

Die ITC bietet somit mit einer einzigen Messung ein komplettes thermodynamisches Profil einer Peptid-Lipid Interaktion und ist daher ein geeignetes Verfahren zur Untersuchung der Rolle von Membranwechselwirkungen für die Wirksamkeit von Peptidantibiotika.

2.2. Antibiotika

Antibiotika sind nach einer Definition von Waksman (1956): „Niedermolekulare Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen, die in niedrigen Konzentrationen das Wachstum anderer Mikroorganismen inhibieren“ [69]. Lancini und Parenti fassten den Begriff des Antibiotikums knapp 30 Jahre später (1982) folgendermaßen zusammen: „Antibiotika sind strukturell verschiedene chemische Verbindungen, die

inhibitorische Aktivität gegen Mikroorganismen, Viren und eukaryotische Zellen aufweisen und mit einigen Ausnahmen dem Sekundärstoffwechsel lebender Organismen entstammen“ [70]. Die Entdeckung der Antibiotika kann als bedeutende Errungenschaft in der Geschichte der Wissenschaft des 20. Jahrhunderts angesehen werden. Damit war man erstmals in der Lage schwere Infektionskrankheiten, die sonst ein sicheres Todesurteil darstellten, zu heilen.

Wichtige Antibiotikaklassen neben den Penicillinen und den verwandten Cephalosporinen bilden außerdem Gyrasehemmer, Aminoglykoside, Glykopeptide, Makrolide und Tetrazykline. Viele Antibiotika leiten sich von Naturstoffen ab und haben abhängig von ihrer zugehörigen Substanzklasse vielfältige Angriffspunkte in Bakterien. Für weitergehende Literatur zu Antibiotika im Allgemeinen sei auf folgende Quellen verwiesen [71,72].

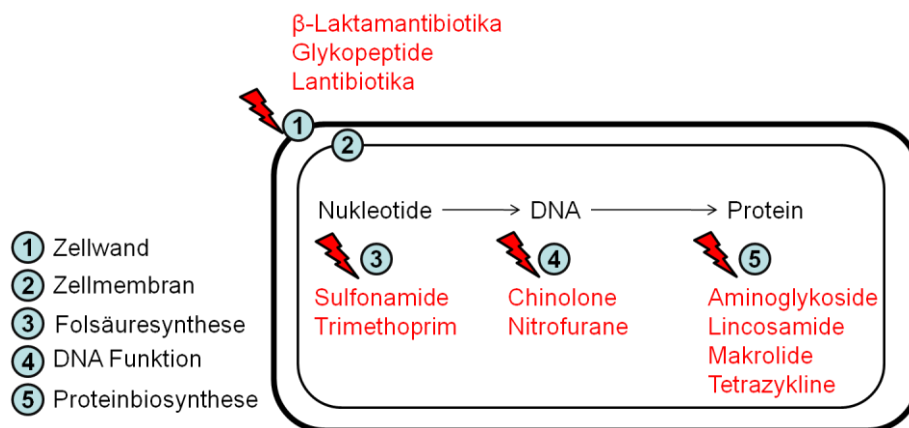


Abbildung 13: Angriffspunkte von Antibiotika an Bakterienzellen.

Folgende strukturelle Grundeinteilung von Antibiotika und deren Zielstrukturen sind in der Literatur beschrieben:

Tabelle 3: Wichtige Antibiotikaklassen [71].

Klasse	Antibiotikum	Zielstruktur	Resistenz
β-Laktame	Amoxicillin	Zellwandenzyme	Modifizierende Enzyme
Glykopeptide	Vancomycin	D-Ala-D-Ala	Targetmutation
Lantibiotika	Nisin	Lipid II	Kationische Membran
Sulfonamide	Sulfamethoxazol	DHF	Targetmutation
Chinolone	Ciprofloxacin	DNA Gyrase	Targetmutation, Efflux
Aminoglykoside	Gentamicin	Ribosom 30S	Modifizierende Enzyme
Lincosamide	Clindamycin	Ribosom 50S	Targetmutation, Efflux
Makrolide	Erythromycin	Ribosom 50S	Targetmutation, Efflux
Tetrazykline	Doxycyclin	Ribosom 30S	Efflux

Im Näheren wird der Fokus auf die zellwandaktiven Antibiotika gelegt. Im Vergleich zu den anderen Antibiotikaklassen fällt auf, dass es sich um Peptide handelt. In einer Datenbank für antimikrobielle Peptide sind ca. 950 Peptide aufgelistet [73,74]. In Abb. 14 ist die Biosynthese der Zellwand grampositiver Bakterien am Beispiel von *Staphylococcus aureus* beschrieben:

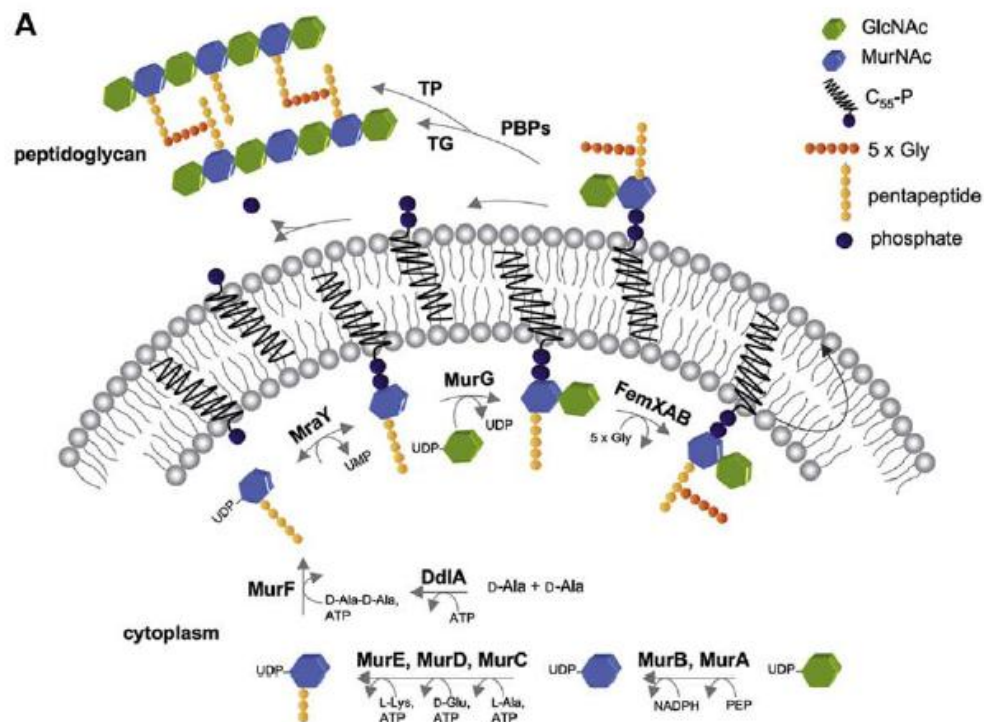


Abbildung 14: Zellwandbiosynthese in *Staphylococcus aureus*; entnommen aus [75].

Die Biosynthese der Zellwand beginnt im Zytoplasma der Bakterienzelle. UDP-GlcNAc wird mittels der Enzyme MurA und MurB zu UDP-MurNAc umgewandelt. Die Enzyme MurCDE fügen jeweils ein Peptid an den Zuckerbaustein. MurF fügt das Dipeptid D-Ala-D-Ala, welches von DdlA unter ATP Verbrauch zusammengebaut wurde, an das UDP-MurNAc. Die Vorstufe UDP-MurNAc-Pentapeptid stellt die letzte wasserlösliche Vorstufe in der Synthese der Zellwand dar. MurA verknüpft UDP-MurNAc-Pentapeptid mit dem Baktopenolphosphat, einem aus 55 Kohlenstoffatomen bestehendem Isoprenengerüst, welches in der Zellmembran verankert ist. Die entstandene Struktur ist das Lipid I. MurG fügt ein weiteres UDP-GlcNAc an das Lipid I an und somit wird das Lipid II gebildet, welches durch einen unbekannten Mechanismus, möglicherweise einer Flipase, membrangebunden an die extrazelluläre Seite gelangt. An dieser Stelle werden GlcNAc und MurNAc als Disaccharideinheit

abgespalten und durch Transpeptidasen und Transglykosylasen in ein dreidimensionales Netzwerk eingebaut. Dieses Gebilde wird als Murein bezeichnet. Nach Abspaltung der Disaccharide verbleibt das Baktopenolpyrophosphat in der Membran und wird unter Phosphatabgabe als Baktopenolphosphat wieder in den Zyklus der Zellwandbiosynthese eingespannt.

Der Ablauf der Zellwandbiosynthese kann an unterschiedlichen Stellen durch Antibiotika attackiert werden.

So hemmt Fosfomycin die Umwandlung von UDP-GlcNAc zu UDP-MurNAc. D-Cycloserin verhindert den Zusammenbau des Dipeptids D-Ala-D-Ala. Friulimicin bindet an Baktopenolphosphat und inhibiert die Reaktion des Enzyms MraY, während Bacitracin die Dephosphorylierung des Baktopenolpyrophosphats blockiert. Die β -Laktamantibiotika bringen die Transpeptidase zum Stillstand und Moenomycin die Transglykosylase. Lipid II wird durch Glykopeptide am D-Ala-D-Ala Motiv und durch Lantibiotika an der Pyrophosphatgruppe gebunden und so dem Kreislauf der Zellwandsynthese entzogen.

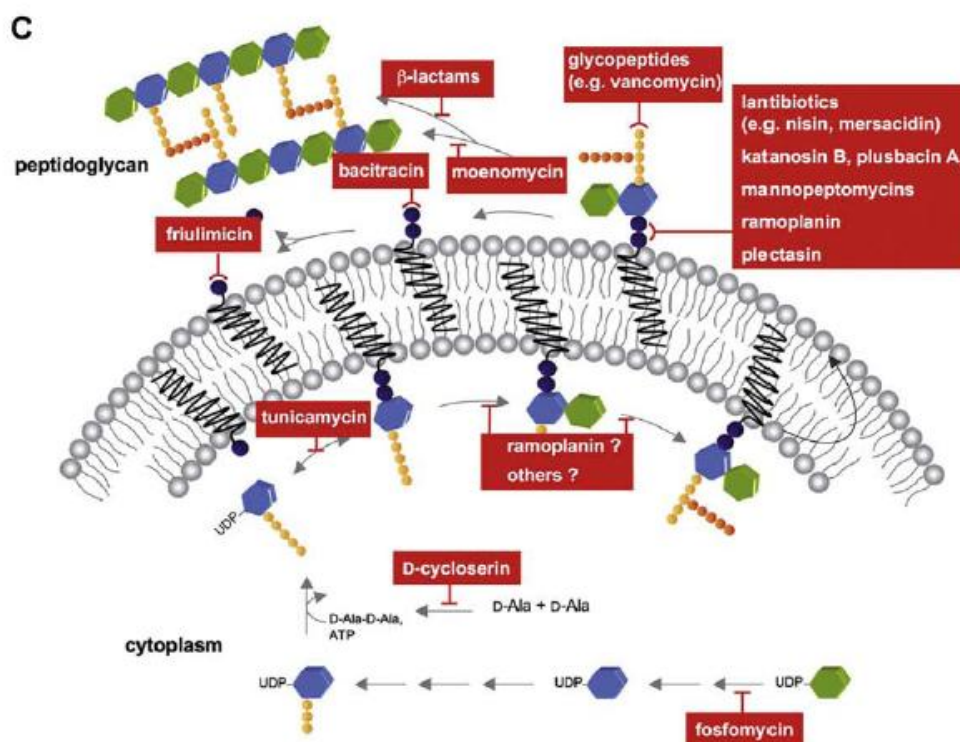


Abbildung 15: Hemmung der Zellwandbiosynthese in *Staphylococcus aureus*; entnommen aus [75].

In den folgenden Kapiteln werden die Antibiotika aus den Klassen der Lantibiotika, Glykopeptide und Lipopeptide näher besprochen.

2.3. Lantibiotika

Lantibiotika sind antimikrobiell wirksame Peptide, die von grampositiven Bakterien produziert werden. Sie gehören zur Klasse I der so genannten Bakteriozine. Dabei handelt es sich um ribosomal synthetisierte Peptide prokaryotischen Ursprungs, die antimikrobielle Eigenschaften aufweisen.

Lantibiotika haben ein Molekulargewicht von weniger als 5 kDa und zeichnen sich durch einen hohen Anteil an ungewöhnlichen Aminosäuren wie Lanthionin (Lan) und 3-Methyllanthionin (MeLan) sowie den ungesättigten Aminosäuren Didehydroalanin (Dha) und Didehydrobutyrin (Dhb) aus. Insgesamt gibt es 17 unterschiedliche Aminosäuren, die in der Sequenz der Lantibiotika auftauchen [76-78].

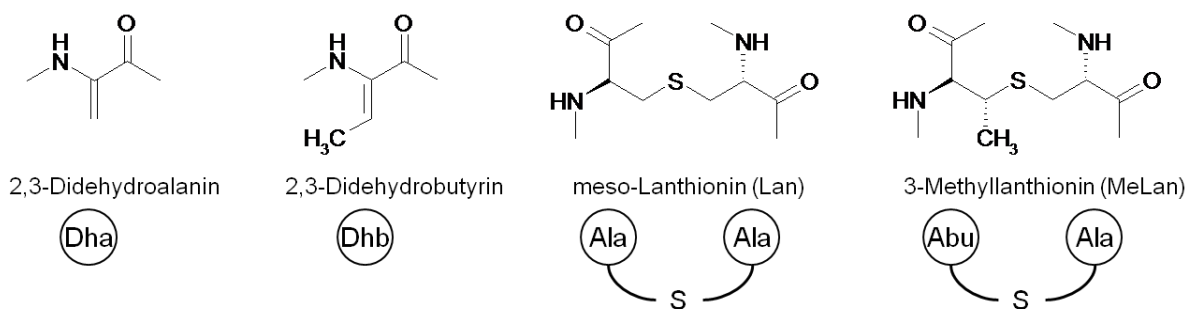


Abbildung 16: Strukturen ungewöhnlicher AS in Lantibiotika.

Zurzeit sind etwa 60 unterschiedliche Lantibiotika bekannt [76].

2.3.1. Einteilung der Lantibiotika

Aktuell gibt es drei Klassifikationen für die Einteilung der Lantibiotika. 1991 hatte Jung die Lantibiotika anhand ihrer chemischen Strukturen und ihrer biologischen Aktivität in zwei Untergruppen gegliedert [79]:

Typ A Lantibiotika sind langgestreckte, amphiphile Peptide, die kationisch sind und meist eine Länge von 22 bis 34 AS haben. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem Nisin als bekanntester Vertreter, Subtilin, Gallidermin, Pep5 sowie Microbisporicin. Lantibiotika, die eine globuläre Form haben, wie Mersacidin, Actagardine, Duramycin und Cinnamycin zählen zum Typ B. Sie tragen entweder eine neutrale oder eine negative Ladung. In den 90er Jahren tauchten immer neuere Lantibiotika auf, die sich

nicht mehr in das gängige Schema sortieren ließen. Dazu gehört Lacticin 481, welches sowohl lineare als auch globuläre Strukturmerkmale in einem Molekül vereint [80]. Somit wurde eine neue Klassifikation aufgestellt, die lineare Vertreter wie Nisin und Gallidermin in Typ AI und Lacticin 481 mit Analoga in Typ AII einstuft [81].

Eine andere Möglichkeit der Einteilung geht von den beteiligten Enzymen in der Biosynthese der Lantibiotika und einer bestimmten Abfolge von Aminosäuren in der Leadersequenz aus.

Damit werden Lantibiotika mit einem „FNLD“-Motiv in der Leadersequenz und den Genen *lanB* und *lanC* im Produzentenstamm zur Klasse I gerechnet. Bei der Klasse II werden die Aufgaben der Gene *lanB* und *lanC* durch ein Gen *lanM* übernommen. Zusätzlich tritt in der Spaltungssequenz die charakteristische Abfolge „GG“ oder „GA“ auf [82]. Klasse III Lantibiotika haben keine antibiotische Wirkung [76], dafür stehen andere morphogenetische Effekte im Vordergrund. Vertreter sind SapB [83], SapT [84] und das neu entdeckte Labyrinthopeptin [85,86].

Außer den einzelnen Peptidantibiotika gibt es noch Zwei-Peptidantibiotika, deren Wirksamkeit durch eine synergistische Wirkverstärkung der beiden Einzelpeptide verbessert wird. Zu dieser Gruppe gehören unter anderem Lacticin 3147 [87], Staphylococcin C55 [88], Plantaricin W [89] und Haloduracin [90]. Das erste Peptid ist meist ein Typ B-Lantibiotikum, während das zweite Peptid zum Typ A zugehörig ist. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über wichtige Lantibiotika:

Tabelle 4: Einteilung wichtiger Lantibiotika.

Lantibiotikum	Einteilung	Mol.Gewicht	Produzentenstamm	Ref.
Nisin Z	Typ AI, Klasse I	3330	<i>Lactococcus lactis</i>	[91]
Subtilin	Typ AI, Klasse I	3317	<i>Bacillus subtilis</i>	[92]
Microbisporicin	Typ AI, Klasse I	2246/2230	<i>Microbispora sp.</i>	[93]
Gallidermin	Typ AI, Klasse I	2164	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	[94]
Mutacin 1140	Typ AI, Klasse I	2263	<i>Streptococcus mutans</i>	[95]
Pep5	Typ AI, Klasse I	3488	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	[96]
Lacticin 481	Typ AII, Klasse II	2901	<i>Lactococcus lactis</i>	[97]
Plantaricin C	Typ AII, Klasse II	2880	<i>Lactobacillus plantarum</i>	[98]
Mersacidin	Typ B, Klasse II	1825	<i>Bacillus ssp.</i>	[99]
Actagardine	Typ B, Klasse II	1890	<i>Actinoplanes liguriae</i>	[100]
Cinnamycin	Typ B, Klasse II	2042	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	[101]
Duramycin	Typ B, Klasse II	2014	<i>Streptomyces cinnamoneus</i>	[101]
SapB	Klasse III	2026	<i>Streptomyces coelicolor</i>	[83]
SapT	Klasse III	2032	<i>Streptomyces tendae</i>	[84]

Lantibiotikum	Einteilung	Mol.Gewicht	Produzentenstamm	Ref.
Labyrinthopeptin	Klasse III	1922	<i>Actinomadura namibiensis</i>	[85]
Lacticin 3147	Zwei-Komponent	3322/2847	<i>Lactococcus lactis ssp.</i>	[87]
Staphylococcin C55	Zwei-Komponent	3339/2993	<i>Staphylococcus aureus C55</i>	[88]
Plantaricin W	Zwei-Komponent	3223/3099	<i>Lactobacillus plantarum</i>	[89]
Haloduracin	Zwei-Komponent	2332/3046	<i>Bacillus halodurans</i>	[90]

2.3.2. Biosynthese der Lantibiotika

Die Gene für die Biosynthese der Lantibiotika sind in Clustern angeordnet und tragen die allgemeine Bezeichnung *lan*. Spezifischere Bezeichnungen werden für die jeweiligen Lantibiotika gewählt (z.B.: *nis* für Nisin und *gdm* für Gallidermin). Die Gencluster befinden sich auf Transposons (Nisin), auf Chromosomen (Subtilin) oder auf Plasmiden (Gallidermin) [77]. In diesen Genclustern sind alle Gene vorhanden, die für die Einführung seltener Aminosäuren, die Regulation der Synthese, den Schutz des Produzenten und die Freisetzung des Lantibiotikums verantwortlich sind [76]. Das *lanA* Gen codiert ein Präpeptid LanA, dessen N-terminale Leadersequenz eine Länge von bis zu 59 AS tragen kann. Die genaue Funktion dieser Sequenz ist bis heute nicht geklärt. Sie sorgt vermutlich für die Inaktivität des Lantibiotikums während der Biosynthese und scheint das Molekül dahingehend in einer Konformation zu halten, die für den reibungslosen Ablauf der anschließenden Veränderungen notwendig ist. Der C-terminale Bereich unterliegt postrationalen Modifikationen, die von den Enzymen LanB und LanC für AI-Lantibiotika oder LanM für AII und B-Lantibiotika ausgeführt werden. Der erste Schritt besteht darin, dass Serin- und Threonin-Reste durch Dehydration (LanB/LanM) zu Didehydroalanin bzw. Didehydrobutyrin oxidiert werden. Im Anschluss werden Dha und Dhb mit Cysteinen aus der Nachbarschaft durch Zyklastasen (LanC/LanM) über nucleophile Michaeladditionen zu Thioetherbrücken miteinander verknüpft [77]. Es entstehen so die für Lantibiotika sehr charakteristischen Aminosäuren Lanthionin (Lan) und Methyllanthionin (MeLan). Einige Lantibiotika wie Epidermin, Gallidermin und Mutacin 1140 verfügen im C-Terminus über die ungewöhnliche Aminosäure S-[(Z)-2-aminovinyl]-D-cystein (AviCys). Das verantwortliche Enzym LanD für die Bildung dieser AS ist im Gen *lanD* codiert [77].

Nach den Modifikationen wird das Präpeptid durch die Translokase LanT aus der Zelle geschleust und gleichzeitig wird mittels der Protease LanP die Leadersequenz

abgespalten [76]. Damit ist das Lantibiotikum aktiv. Die Produzentenzellen schützen sich selbst durch spezifische Immunitätsproteine LanEFG, die ABC-Transporter darstellen und das Protein LanI, das in der bakteriellen Zellhülle lokalisiert ist [76,77].

Die regulatorischen Gene *lanR* und *lanK* steuern die Biosynthese der Lantibiotika und die Expression der Immunitätsproteine des Produzentenstammes [76]. Am Beispiel des Nisin A ist die Abfolge der Modifikationen in Abb. 17 dargestellt:

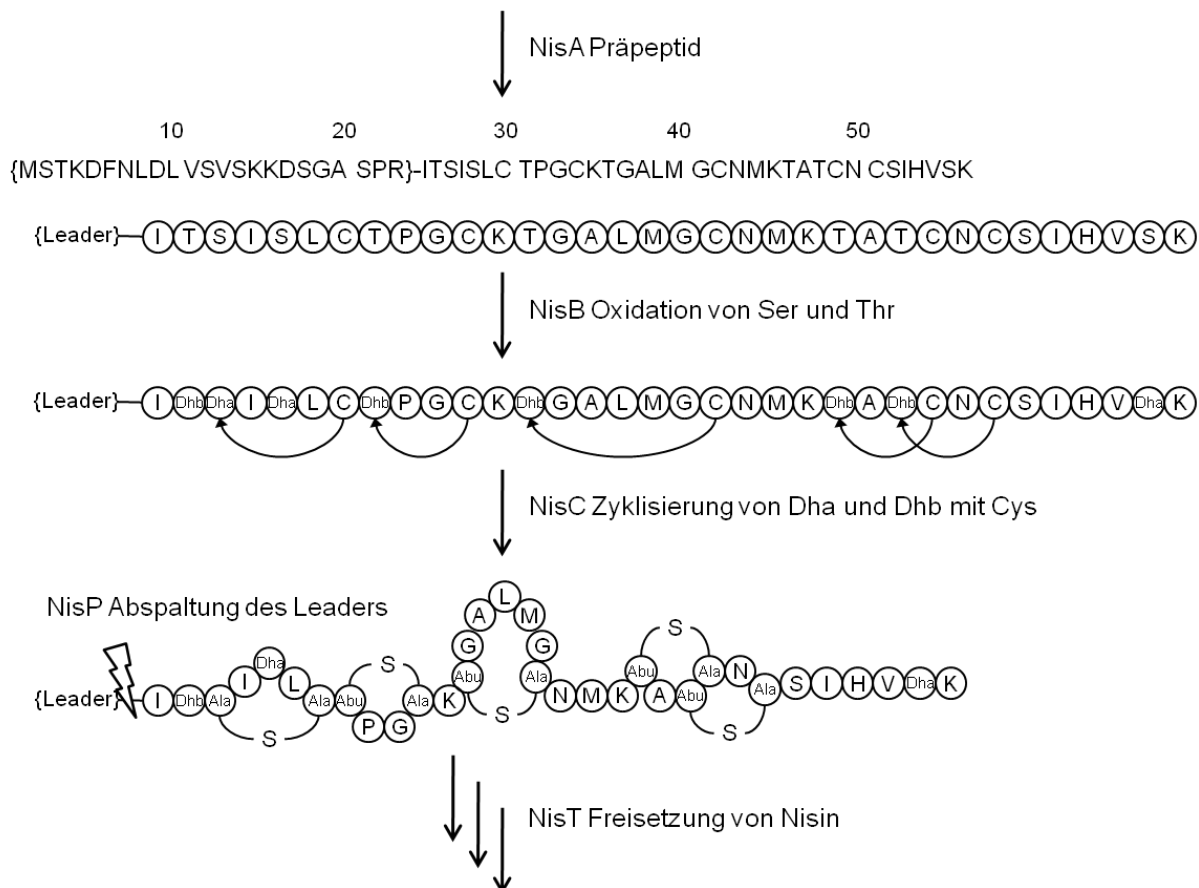


Abbildung 17: Posttranslationale Modifikationen am Lantibiotikum Nisin. Oxidation von Serin- und Threoninresten durch NisB. NisC katalysierte Zyklisierung der entstandenen AS Dha und Dhb mit Cysteinen zu Lan bzw. MeLan. Spaltung der Leadersequenz (NisP) und Freisetzung des Lantibiotikums (NisT).

2.3.3. Nisin

Nisin ist der bekannteste Vertreter der Typ A Lantibiotika. Interessanterweise wurde der antimikrobielle Effekt des Nisins bereits in der 1920er Jahren entdeckt. Dabei wurde beobachtet, wie bestimmte Milchkulturen die Produktion anderer Bakterien inhibierten [102]. Produziert wird Nisin von Stämmen des Milchsäurebakteriums *Lactococcus lactis*. Die antimikrobiellen Eigenschaften des Nisins wurden 1944 von Mattick und Hirsch beschrieben [103]. Auch wurde der Name Nisin aus Group N

Inhibitory Substance hergeleitet [104]. Die Struktur des Nisins wurde erst durch umfangreiche Arbeiten von Gross und Morell aufgeklärt. Hierbei entdeckten sie die Anwesenheit ungewöhnlicher AS wie Dha und weiterer AS [105-107]. Ferner folgte eine Beschreibung über die Sulfidbrücken [108] und schließlich wurde die Struktur des Nisins 1971 postuliert [109] und 1988 durch genetische Analysen des Präpeptids [110] und FAB-Massenspektrometrie bestätigt [111].

Mittlerweile gibt es fünf Varianten des Nisins, die sich in einigen AS voneinander unterscheiden. Es handelt sich dabei um die Formen Nisin A, Z, Q, U und F [76]. In dieser Arbeit wurde mit der Variante Nisin Z gearbeitet. Das Präpeptid des Nisin Z besteht aus 57 AS. Nach Abspaltung der Leadersequenz verfügt das aktive Nisin über 34 AS und hat ein Molekulargewicht von 3330 Da. Das Peptid trägt vierfach positive Ladungen, die durch drei Lysin- und einen Histidinrest bedingt sind.

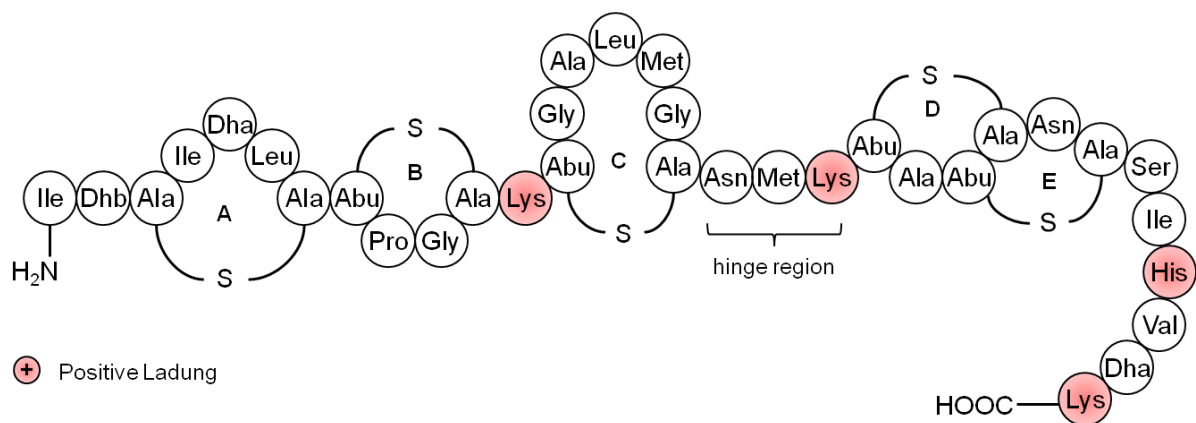


Abbildung 18: Struktur des Nisin Z. Das Lantibiotikum ist ein pentazyklisches Peptid mit vierfach positiver Ladung. Es verfügt über einen Lanthioninring (A) und drei Methyllanthionine (B-E). Zwischen den Ringen ABC und DE befindet sich eine flexible Region (hinge region).

Nisin ist aufgrund der Thioetherbrücken eines Lanthionins und vier Methyllanthionine ein pentazyklisches Peptid. Man kann das Molekül in zwei Bereiche gliedern. Der N-terminale Bereich besteht aus den Ringen A-C. Diese Region ist starr und essentiell für die Wirksamkeit. Zwischen den Ringen C und D befindet sich eine Gelenkregion (engl. „hinge region“), die in den C-terminalen Bereich mündet. Dieser Molekülteil ist sehr flexibel. Der Anteil an hydrophoben Aminosäuren beträgt ca. 44%. Aus NMR-Messungen konnte eine Länge von 50 Å kalkuliert werden [112].

2.3.4. Wirkspektrum Typ A Lantibiotika

Nisin und weitere Typ A Lantibiotika sind bereits in geringen Konzentrationen wirksam gegen viele grampositive Bakterienstämme, wie nosokomiale Erreger der Methycillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, Vancomycin resistente Enterokokken (VRE) [113] und *Clostridium difficile* [76]. Außerdem wird das Wachstum von Bazillen- und Clostridiensporen inhibiert [114]. Beteiligt ist hier die AS Dha in Position 5. Gramnegative Bakterien wie *Escherichia coli* sind aufgrund der Barrierefunktion ihrer äußeren Membran unempfindlich gegenüber den Lantibiotika. In Präsenz von Chelatoren wie EDTA werden die äußeren Membranschichten zerstört und gramnegative Bakterien werden dann sensitiv gegenüber Nisin [115]. Pilze, Hefen und menschliche Zellen sind dagegen unempfindlich gegen Lantibiotika, selbst im mM Bereich kann keine Schädigung festgestellt werden [116]. Weitere Wirkungen von Nisin liegen in der Aktivierung autolytischer Enzyme in Staphylokokken [117] und der Hemmung der Motilität von Spermien [118]. Die Inhibition der Zellwandbiosynthese grampositiver Bakterien und der genaue Wirkmechanismus werden in Kapitel 2.3.13 besprochen.

2.3.5. Resistenzen gegen Nisin

In Laborversuchen konnten einige Bakterienstämme, wie z.B. *Listeria monocytogenes* gegen Nisin resistent gezüchtet werden. Dabei war eine wiederholte Exposition niedriger Mengen notwendig, um den Selektionsdruck der bakteriellen Erreger zu trainieren. Der Resistenzmechanismus resultiert aus einer veränderten Phospholipidzusammensetzung, die einerseits die Membran rigider macht und andererseits die Ladung modifiziert, um damit eine erfolgreiche Anlagerung des Lantibiotikums verhindert [119].

2.3.6. Einsatz des Nisins

Nisin wird seit über 40 Jahren weltweit als Konservierungsmittel eingesetzt. Von der FDA erhielt Nisin 1988 den GRAS Status (engl. „Generally Recognized As Safe“) [120] und gilt in den USA als sicherer Zusatzstoff für Lebensmittel. Die europäische Union hat 1995 Nisin in die Richtlinie für Zusatzstoffe aufgenommen [121]. In Deutschland ist in der Verordnung über Anforderungen an Zusatzstoffe (ZVerkV) das

Inverkehrbringen von Zusatzstoffen für technologische Zwecke geregelt [122]. Als Konservierungsmittel trägt Nisin die Bezeichnung E 234. Der Einsatz des Nisins in der EU ist in gereiftem Käse, Schmelzkäse, bestimmten Puddings und Mascarpone erlaubt. Im Magen-Darm-Trakt wird Nisin durch Trypsin inaktiviert. Daher führt ein Konsum von konservierten Produkten zu keinen unerwünschten Effekten auf die Bakterienflora des Darms. Eine Anfrage an die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) über die Sicherheit der Verwendung des Nisins wurde in einem Gutachten im Jahre 2006 beantwortet [123]. Das Expertengremium der EFSA kam zu dem Schluss, dass der Einsatz des Nisins als Konservierungsmittel unbedenklich sei und trotz jahrelangen Konsums keine Anzeichen von Schäden feststellbar waren; zusätzlich wurden auch keine Kreuzresistenzen gegenüber therapeutisch eingesetzten Antibiotika beobachtet. Neben dem kommerziellen Einsatz von Nisin A (Nisaplin®) in der Lebensmittelbranche wird Nisin aber auch zur Behandlung der Rindermastitis erfolgreich verwendet [124]. Durch die spermizide und auch gleichzeitig antimikrobielle Wirkung ist ein Einsatz zur Vorbeugung der Übertragung sexueller Erreger empfohlen worden [125].

2.3.7. Gallidermin

Ein weiterer Vertreter der Typ A Lantibiotika ist Gallidermin, das von *Staphylococcus gallinarum* produziert wird. Gallidermin wurde 1988 von der Arbeitsgruppe Jung vorgestellt [94]. Die Isolation und Charakterisierung der an der Biosynthese beteiligten Gene erfolgte durch Arbeiten von Schnell und Ottenwälder [126,127]. Das Präpeptid besteht aus 52 AS. Nach Abspaltung der Leadersequenz verbleiben 22 AS. Eine Besonderheit ist die ungewöhnliche AS AviCys, die durch das Enzym GalD gebildet wird [77]. Bei Gallidermin handelt sich um ein Struktur analogon des Epidermins, welches von *Staphylococcus epidermidis* produziert wird [128]. Beide Substanzen unterscheiden sich in der AS an Position 6. Jedoch hat dieser Unterschied keinen Einfluss auf die Wirksamkeit.

Gallidermin hat ein Molekulargewicht von 2164 Da und trägt eine zweifach positive Nettoladung. Durch das Fehlen der C-terminalen Carboxylgruppe ist die Ladung bei physiologischen pH-Wert dreifach positiv.

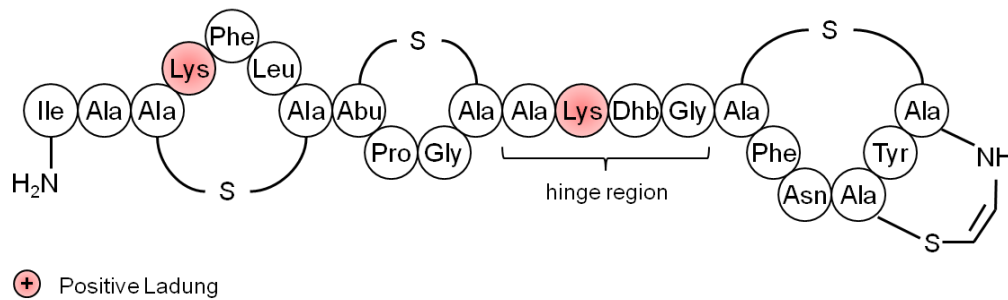


Abbildung 19: Struktur des Gallidermins. Das Lantibiotikum verfügt über vier Ringe und eine zwei positive Ladungen. Gallidermin hat zwei Lanthionine, ein Methyllanthionin sowie ein Aminovinylcystein.

Im Vergleich zum Nisin hat es einen ähnlichen N-Terminus. Allerdings fehlt an dieser Stelle der C-Ring. Gallidermin hat gegenüber Nisin einen verkleinerten C-Terminus, dafür ist die hinge region vergrößert. Die AS Dha fehlt komplett. Der Anteil an hydrophoben Aminosäuren liegt bei 45%. Eine 3d-Struktur wurde aus NMR-Daten erstellt. Gallidermin nimmt eine schraubenförmige räumliche Anordnung an, die einen hydrophilen, geladenen N-Terminus und einen kompakten, lipophilen C-Terminus besitzt. Die Länge des Moleküls liegt bei ca. 30 Å. Der Durchmesser wurde mit 8-10 Å berechnet [129].

2.3.8. Wirkspektrum des Gallidermin

Gallidermin ist gegen ein breites Spektrum grampositiver Bakterien wirksam. Dazu gehören z.B. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Lactococcus lactis* und *Micrococcus flavus*. Gallidermin ist außerdem sehr wirksam gegen *Propionibacterium acnes*, das eine Rolle in der Pathogenese der Akne spielt [94].

Als mögliches Einsatzgebiet ist eine transdermale Applikationsform des Gallidermins zur Behandlung der Akne in der Diskussion [130].

2.3.9. Subtilin

Weitere Typ A Lantibiotika sind Subtilin, Pep5 und Microbisporicin. Subtilin, das von *Bacillus subtilis* produziert wird, war nach Nisin das zweite Lantibiotikum das beschrieben wurde [92,131]. Dem Nisin ist es strukturell sehr ähnlich. Beide Peptide haben an Position 5 ein Dha. An Position 1 trägt das Subtilin allerdings ein Trp. Auch das Wirkspektrum ist vergleichbar mit dem des Nisins. Das Präpeptid des Subtilins hat 56 AS.

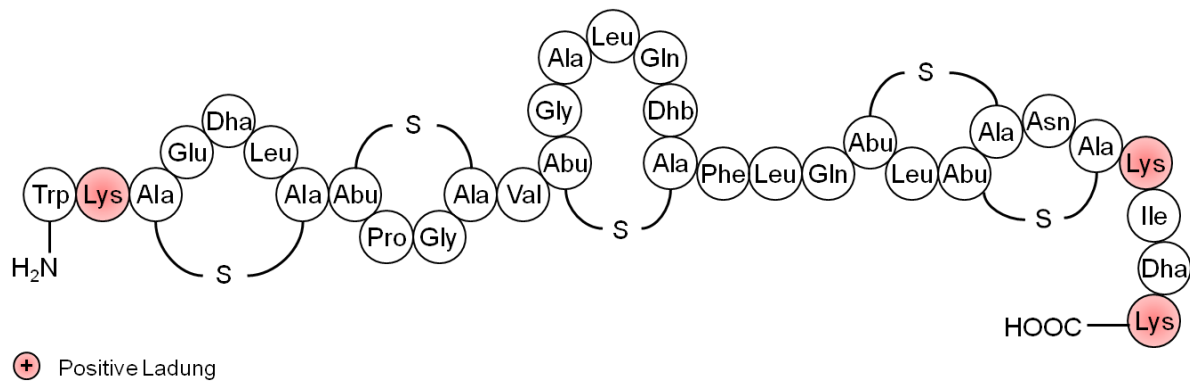


Abbildung 20: Struktur des Subtilins. Das pentazyklische Lantibiotikum verfügt über eine dreifach positive Ladung, ein Lanthionin und drei Methyllanthionine.

Nach Abspaltung der Leadersequenz verfügt das aktive Lantibiotikum noch über 32 AS und ein Molekulargewicht von 3317 Da. Die Nettoladung beträgt +2 und 43% der AS des Subtilins sind lipophil.

2.3.10. Pep5

Pep5 (3488 Da) ist ein weiterer Vertreter aus der Gruppe der Typ A Lantibiotika [96]. Es wurde aus *Staphylococcus epidermidis* isoliert. Das Präpeptid besitzt 60 AS. An der ersten Position des 34 AS langen Peptids befindet sich ein 2-Oxobutyrylrest. Zwei Arg und fünf Lys führen zu einer achtfach positiven Nettoladung.

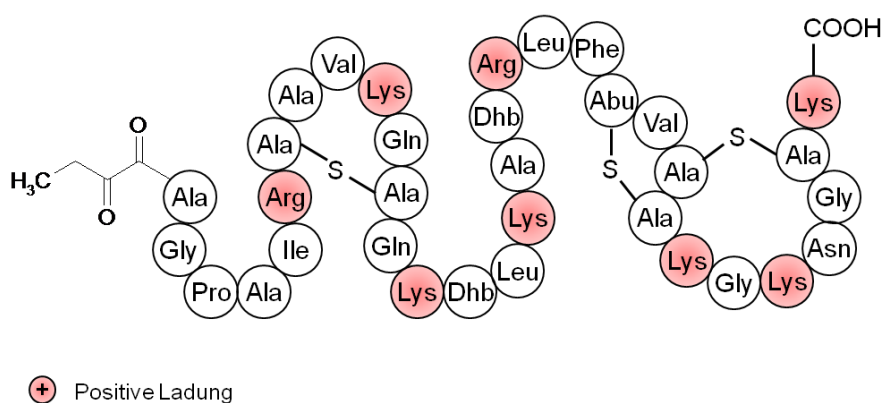


Abbildung 21: Struktur des Pep5. Das Molekül verfügt über zwei Lanthionine und ein Methyllanthionin. Pep5 hat eine achtfach positive Ladung und trägt an Position 1 einen 2-Oxobutyrylrest.

Der hydrophobe AS-Anteil liegt bei 38%. Somit ist die Substanz sehr polar und nimmt in wässriger Lösung zunächst eine ungeordnete Struktur an, die bei Lipidzugabe helikal wird [112].

2.3.11. Microbisporicin

Microbisporicin ist ein neues Typ A Lantibiotikum, das der Untergruppe AI zugeordnet werden kann und von *Microbispora* Arten produziert wird [93]. Es existieren zwei Formen, A1 (2246 Da) und A2 (2230 Da), die in einem Verhältnis von 60:40 vorliegen. Die Struktur enthält 24 AS und zwei neue posttranslationale Modifikationen. Dazu gehören ein 5-Chlorotryptophan an Position 4 und ein hydroxyliertes Prolin an Position 14 bei dem A2 Peptid, oder ein Prolin mit zwei Hydroxylgruppen bei der A1 Variante. Bei pH=7 trägt Microbisporicin eine positive Ladung am N-Terminus.

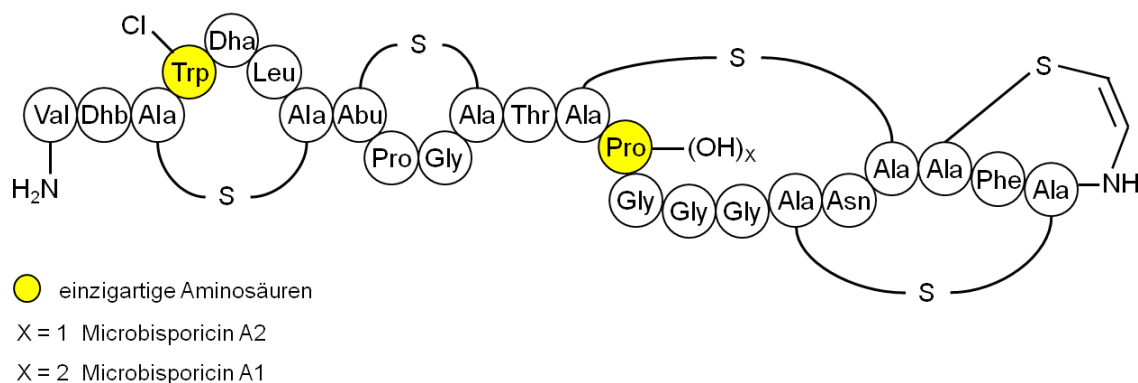


Abbildung 22: Struktur des Microbisporicin. Das neue Lantibiotikum hat drei Lanthionine, ein Methyllanthionin, ein Aminovinylcystein und als einzigartige Aminosäuren ein chloriertes Tryptophan und hydroxyliertes Prolin.

Microbisporicin zeigt die stärkste Wirksamkeit aller Lantibiotika. Gegen MRSA und Vancomycin resistente *Staphylococcus aureus* beträgt die MIC < 0.13 µg/mL. Weitere sensitive Erreger sind unter anderem die grampositiven Bakterien *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus garvieae* und das gramnegative *Neisseria meningitidis* [93]. Gegen andere gramnegative Keime wie *Escherichia coli* ist aber auch Microbisporicin nahezu wirkungslos.

2.3.12. Lacticin 481 und Plantaricin C

Zu den Typ AII Lantibiotika gehören Lacticin 481 und Plantaricin C. Die posttranslationalen Modifikationen, wie die Oxidation von Ser und Thr und die anschließende Zyklisierung mit Cys werden durch das Enzym LanM ausgeführt. Generell haben diese Lantibiotika einen linearen N-Terminus und gleichzeitig einen globulären C-Terminus [77].

Lacticin 481 wird von *Lactococcus lactis* produziert und hat ein Molekulargewicht von 2901 Da [97]. Das Präpeptid hat 57 AS, das aktive Lantibiotikum besteht aus 27 AS. Im Molekül sind zwei Lan und ein MeLan. Die Gesamtladung ist zweifach positiv. Plantaricin C (2880 Da), produziert aus *Lactobacillus plantarum*, hat 27 AS und besitzt ein Lan und drei MeLan [98]. Die Struktur hat fünf positive und zwei negative AS.

2.3.13. Wirkmechanismus der Typ A Lantibiotika

In den letzten Jahren ist klar geworden, dass die Wirkmechanismen der antibiotischen Aktivität der Lantibiotika vielfältig sind, und unter Umständen mehrere Prozesse involviert sind, die einen Beitrag zur Gesamtwirksamkeit leisten. Nach der Strukturaufklärung des Nisins Anfang der 1970er Jahre begann die Erforschung des Wirkmechanismus der Lantibiotika. Ein Großteil der Experimente fokussierte dabei auf die Lyse bakterieller Zellmembranen durch Nisin. Meist wurden Studien an Modellmembranen durchgeführt und die Permeabilität der Membran untersucht. Als Linett und Strominger 1973 die Störung der Zellwandbiosynthese durch Nisin und Subtilin veröffentlichten [132] gab es noch keine Anzeichen für eine definierte Zielstruktur in der bakteriellen Zellwand. Porenbildung ist eine weitverbreitete Eigenschaft antimikrobieller Peptide. Man nahm diesen Weg als primären Wirkmechanismus dieser Antibiotikaklasse an. Ruhr und Sahl berichteten 1985, dass die Zytoplasmamembran die primäre Zielstruktur des Nisins ist, und dass infolge der Membranzerstörung der Efflux von wichtigen Metaboliten und Ionen stattfindet [133]. Die Depolarisation der Membran war stets abhängig von einem Grenzpotential. Diese transmembranäre Potentialdifferenz sollte die Porenbildung begünstigen [134]. Nisin und Pep5 formen kurzlebige Poren mit einem Durchmesser von 1-2 nm in Bakterienmembranen [133,135].

Der Bindungsprozess startet zunächst mit der Anlagerung des Nisins an die Oberfläche von Zellmembranen. Dabei spielt der C-Terminus eine große Rolle. Es kommt zu ionischen Wechselwirkungen zwischen dem positiv geladenen Teil des C-Terminus und negativ geladenen Phospholipiden der Membran. Um den Vorgang der Porenbildung besser zu beschreiben, wurden zwei Modelle vorgeschlagen:

Im Barrel-Stave-Modell binden die kationischen Peptide durch elektrostatische Anziehung an die Membranoberfläche. Ab einem bestimmten Membranpotential

nehmen die Peptide eine senkrechte Anordnung zur Oberfläche der Membran ein und bilden eine Pore.

Beim Wedge-Modell haben die an der Oberfläche angelagerten Peptide eine parallele Ausrichtung zur Membran. Die Peptide aggregieren und biegen die polaren Phospholipidenden keilförmig durch die Membran, so dass eine ringförmige Pore durch die Membran gestaltet wird [136,137].

In der Folgezeit wurde die Auswirkung von Mutanten des Nisin auf die Porenbildungsfähigkeit untersucht [134]. Generell konnte gezeigt werden, dass die Ladung der anionischen Modellmembran und des kationischen Peptids eine große Auswirkung auf die Porenbildung haben [138]. Da grampositive Bakterien einen hohen Gehalt an anionischen Phospholipiden in ihrer Membran aufweisen, ist diese Erkenntnis somit wichtig für die Deutung der unspezifischen Wechselwirkung zwischen kationischen Peptiden und Bakterienmembranen.

Aber auch die Zusammensetzung der Modellmembranen (Planare Schichten oder Vesikel) hat einen großen Einfluss auf das Ausmaß der Porenbildung [134,139]. Die *in vitro* Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Lantibiotika haben viele wertvolle Hinweise über die Interaktion mit Lipidmembranen erbracht, jedoch konnten sie nicht die Diskrepanz zwischen den geringen wirksamen Konzentrationen (nM) in Bakterien und den hohen erforderlichen Mengen (μ M) in Modellmembranen erklären. Erst Breukink et al. konnten 1999 eindeutig zeigen, dass der Grund für die *in vivo* Wirksamkeit der porenbildenden Lantibiotika in der Inhibition einer definierten Zielstruktur in der Bakterienmembran begründet war [140]. Die Zielstruktur für die Lantibiotika ist die Zellwandvorstufe Lipid II, die eine essenzielle Rolle im Aufbau der Zellwand grampositiver Bakterien spielt. Die Anwesenheit von Lipid II in Modellmembranen führte zu einer 1000fach höheren Wirkung des Nisins [141]. In weiteren Untersuchungen [142] stellte sich heraus, dass Lipid II Einfluss auf die Konformation des Nisins hat [143], und auch selbst Bestandteil der gebildeten Pore ist [144]. Bonev et al. fanden heraus, dass die Bindung des Nisins hauptsächlich auf die Pyrophosphatgruppe des Lipid II gerichtet ist [145]. Schließlich gelang es Hsu und Mitarbeitern mittels NMR-Messungen den genauen Wirkmechanismus des Nisins an Lipid II aufzuklären [146]:

Nach Annäherung an die Membran bindet Nisin mit dem N-Terminus unter Ausbildung mehrerer Wasserstoffbrücken an die Sauerstoffatome der Pyrophosphat-Gruppe des Lipid II. Beteiligt sind unter anderem die AS Dhb2, Ala3, Ile4, Dha5 und

Abu8. Diese sogenannte Pyrophosphat-Käfigstruktur (engl. „pyrophosphate cage“) bildet die Grundlage für die Hemmung der anschließenden Schritte der Zellwandbiosynthese. Mit einer Stöchiometrie von 8:4 Nisin zu Lipid II-Molekülen wird Lipid II außerdem als Ankermolekül für eine mögliche Porenbildung benutzt [147].

Lantibiotika wie Nisin, bei denen eine bestimmte Abfolge von AS im N-Terminus konserviert vorliegt, weisen also einen dualen Wirkmechanismus auf. Es kommt zur Hemmung der bakteriellen Zellwandsynthese und zusätzlich tritt Zelllyse infolge der Porenbildung auf [148]. Abb. 23 veranschaulicht diesen Vorgang:

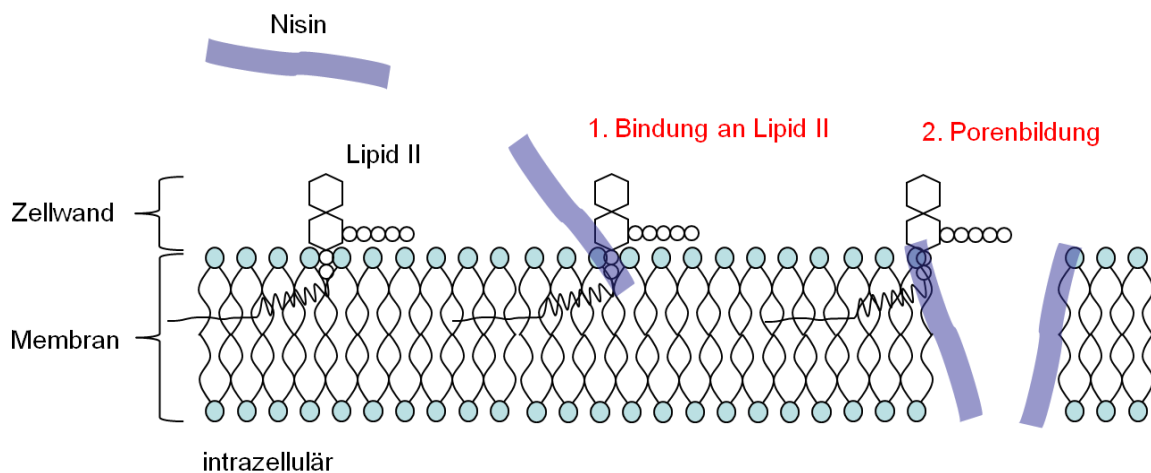


Abbildung 23: Dualer Wirkmechanismus des Nisins: 1.) Bindung an Lipid II führt zur Hemmung der Zellwandbiosynthese. 2.) Anschließende Porenbildung unter Verwendung des Lipid II als Anker resultiert in der Lyse der Bakterienzelle.

Durch die flexible Gelenk-Region ist der C-Terminus des Nisins befähigt die Membran zu umspannen und so eine Pore zu formen. Bei gezielten Mutationen im Bereich des C-Terminus ging die Eigenschaft der Porenbildung verloren [148].

Mit den Biosensortechniken QCM und CV wurde die Rolle des Lipid II auf die Membranbindung und Porenbildung des Nisins untersucht [21]. Die Anwesenheit des Lipid II in einer DOPC-Modellmembran führte zu einer Zunahme der Affinität um eine Zehnerpotenz auf 1×10^{-6} mol/L. Für eine Porenbildung in targetierten Membranen war sogar eine nM Nisinmenge ausreichend, während die unspezifischen Poren eine μ M Nisinkonzentration erforderten. Auch eine ITC-Messung des Nisin Z mit DOPC und DOPC/DOPG Vesikeln wurde von Breukink et al. durchgeführt [58]. Dabei konnte der Einfluss der Ladung auf die Bindung an neutrale bzw. anionische Membranen deutlich gezeigt werden.

Allerdings bilden nicht alle Typ A Lantibiotika Poren. Gallidermin hat einen ähnlichen N-Terminus wie Nisin und besitzt damit auch die Fähigkeit Lipid II zu komplexieren, ist allerdings um 13 AS kleiner. Außerdem ist der C-Terminus zusätzlich durch ein AviCys-Lan Doppelringsystem kompakter geformt als bei Nisin. Diesem Umstand wurde bei der Untersuchung der Porenbildung des Gallidermins in Modellmembranen nachgegangen. Bonelli et al. haben die Permeabilisierung der Membran durch Gallidermin an unterschiedlichen Bakterienstämmen und Vesikeln gemessen und mit Nisin verglichen [149]. Gallidermin war in der Lage bei Vesikeln mit einer Membrandicke von ≤ 14 Kohlenstoffatomen (DmPC) eine Pore zu formen. Interessanterweise war Gallidermin in vivo an *Lactococcus lactis* wirksamer als Nisin trotz fehlender Porenbildung. Somit ist der Effekt der Synthesehemmung des Lipid II schon ausreichend für eine bakterizide Wirkung, ohne dass eine Pore geformt werden muss. Unterstützt wird diese These durch Hasper et al., die einen alternativen Wirkmechanismus für Vertreter der Typ A Lantibiotika vorschlagen, die zu kurz für eine Porenbildung sind aber das Lipid II-Bindungsmotiv enthalten [150]. Dabei wird Lipid II aus den funktionellen Regionen (Septum) entfernt, in denen die Zellwandbiosynthese während der Zellteilung stattfindet und in unphysiologische Bereiche sequestriert.

2.3.14. Bisherige Biosensormessungen

In weiteren Biosensoruntersuchungen (QCM und CV) konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der Lipidzusammensetzung der Bakterienspezies auch eine Auswirkung auf die in vitro Wirksamkeit des Gallidermins in Modellmembranen haben [40]. In diesen Versuchen wurden verzweigt-kettige Fettsäuren in die Lipidmatrix zu 20% eingebaut und Gallidermin mit Nisin hinsichtlich der Bindung und der Porenbildung verglichen. So war Gallidermin in den Membranen ohne Verzweigung nicht in der Lage eine Pore auszubilden, während der Einbau der Verzweigungen zu einem deutlichen Anstieg der Porenbildung geführt hatte. Die Charakteristik der Modellmembran spiegelt in diesem Fall die unterschiedlichen Einflüsse der Bakterienspezies in vivo wider und könnte eine Erklärung für das enge Wirkspektrum einiger Lantibiotika liefern.

2.3.15. Typ B Lantibiotika

Typ B Lantibiotika sind kleine (bis 22 AS), globulär gebaute Peptide und tragen meist keine oder negative Nettoladungen. Vertreter dieser Gruppe sind Mersacidin, Actagardine, Cinnamycin und Duramycin.

2.3.16. Mersacidin

Mersacidin wird aus *Bacillus ssp.* gewonnen und weist ein Molekulargewicht von 1825 Da auf [99]. Das Präpeptid verfügt über 68 AS. In der Struktur des 20 AS langen Peptids gibt es drei MeLan und ein AviCys, das methyliert ist. Die ersten beiden AS bilden bereits das erste MeLan. Mersacidin hat eine negative Nettoladung an Position 17.

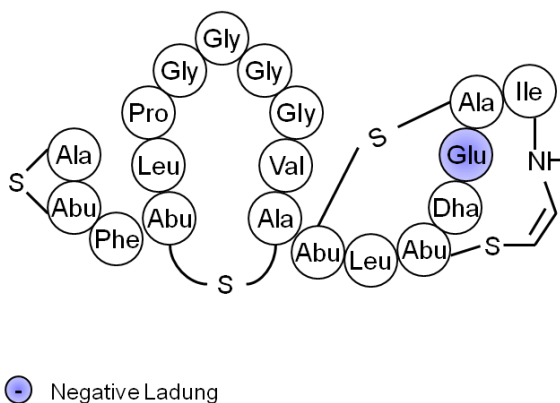


Abbildung 24: Struktur des Mersacidin. Das Typ B Lantibiotikum hat drei MeLan und ein methyliertes AviCys. Zusätzlich trägt es eine negative Ladung.

Der hydrophobe AS Anteil macht 45% aus. Zwischen den Positionen Ala12 und Abu13 ist eine flexible Region, die erst durch NMR-Messungen aufgedeckt wurde und die Geometrie der Struktur beeinflussen kann [151].

Mersacidin ist wirksam gegen Methicillin- und Vancomycin resistente *Staphylococcus aureus* Stämme.

Das grampositive Bakterium *Actinoplanes liguriae* sezerniert Actagardine (1890 Da) [100]. Das 19 AS große Peptid hat ein Lan und drei MeLan. Des weiteren verfügt Actagardine über eine negative Ladung und bei einem MeLan ist der Schwefel oxidiert. Das Peptid ist sehr hydrophob (57% der AS).

Cinnamycin und Duramycin werden in *Streptomyces cinnamoneus* Stämmen gebildet und haben ein Molekulargewicht von 2042 Da bzw. 2014 Da. Beide Peptide haben 19 AS und besitzen ein Lan und zwei MeLan-Ringe.

2.3.17. Wirkmechanismus der Typ B Lantibiotika

Mersacidin hemmt die Zellwandbiosynthese durch Blockade der Transglykosylierung [152]. Diese wird durch Bindung des Lipid II hervorgerufen. Allerdings erfolgt die Bindung an eine andere Domäne des Lipid II als bei Nisin. Die Sequenz für die Bindung an die Pyrophosphat-Struktur ist nicht vorhanden. Lipid I wird nicht targetiert. Daher ist GlcNAC in den Wirkmechanismus des Mersacidins involviert. Bindungsstudien hatten gezeigt, dass die Zugabe von Calcium eine Wirkverstärkung des Mersacidins verursacht [153]. Da Mersacidin an Position 17 ein Glu und damit eine negative Ladung trägt, wäre eine ladungsinduzierte Anlagerung an eine anionische Membran wie bei Typ A Lantibiotika sehr unwahrscheinlich. Es wird vermutet, dass das positive geladene Kation eine Brückenfunktion zwischen dem negativ geladenen Lantibiotikum und der Membran ausübt. Dass Glu17 für die Wirkung von Mersacidin von essenzieller Natur ist, wurde durch Austausch der AS gegen Ala eindeutig nachgewiesen [154].

Cinnamycin und Duramycin hemmen die Phospholipase A2 durch Bindung an das Substrat Phosphatidylethanolamin [54,155].

Anders als die Typ A Lantibiotika bilden Mersacidin, Actagardine und Cinnamycin keine Poren.

2.3.18. Labyrinthopeptin

Zur Klasse III der Lantibiotika gehören Labyrinthopeptin, SapB und SapT. Das Labyrinthopeptin A2 wird aus *Actinomadura namibiensis* Stämmen gewonnen und hat 18 AS [85,86]. Die Struktur ist globulär und trägt die neue, zuvor unbekannte Aminosäure Labionin. Es handelt sich dabei um eine carbacyclische Seitenkettenverknüpfung mit quartärem C-Atom an ein Lanthionin. Weiterhin ungewöhnlich ist eine Disulfidverknüpfung zwischen zwei Cys. Das MW beträgt 1922 und die Gesamtnettoladung ist zweifach negativ durch ein Asp und Glu.

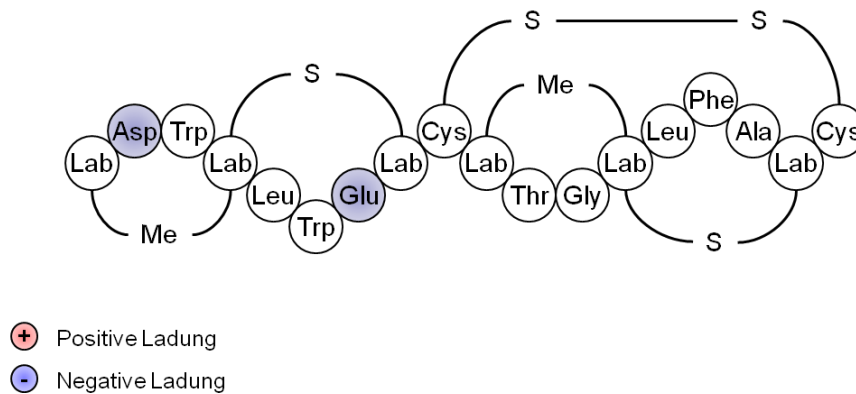


Abbildung 25: Struktur des Labyrinthopeptin A2. Das Klasse III-Lantibiotikum hat als einzigartige AS zwei Labionine. Zusätzlich ist eine Disulfidbrücke im Molekül. Zwei AS sind negativ geladen.

Typischerweise zeigen Klasse III Lantibiotika keine antimikrobiellen Eigenschaften mehr. In in vitro Messungen wurden dem Labyrinthopeptin A2 antivirale Effekte gegen Herpes simplex zugeschrieben [156]. Dagegen wurde eine signifikante Wirksamkeit gegen neuropathische Schmerzen im Mausmodell festgestellt [157]. Daher wäre ein möglicher Einsatz bei neuropathischen Schmerzen vielversprechend.

2.3.19. Zwei-Komponenten Lantibiotika

Die bisher betrachteten Lantibiotika erzielen ihre Wirkungen stets als Einzelmoleküle. Bei einigen Lantibiotika ist der duale Wirkmechanismus des Einzelmoleküls auf zwei Moleküle aufgeteilt. In letzter Zeit werden vermehrt Zweikomponentensysteme entdeckt, deren volle Wirksamkeit erst durch synergistische Aktivität beider Komponenten erfolgt. Zu dieser Gruppe gehören Plantaricin W α und β , Staphylococcin C55 α und β , sowie Lacticin 3147 A1 und A2 [77].

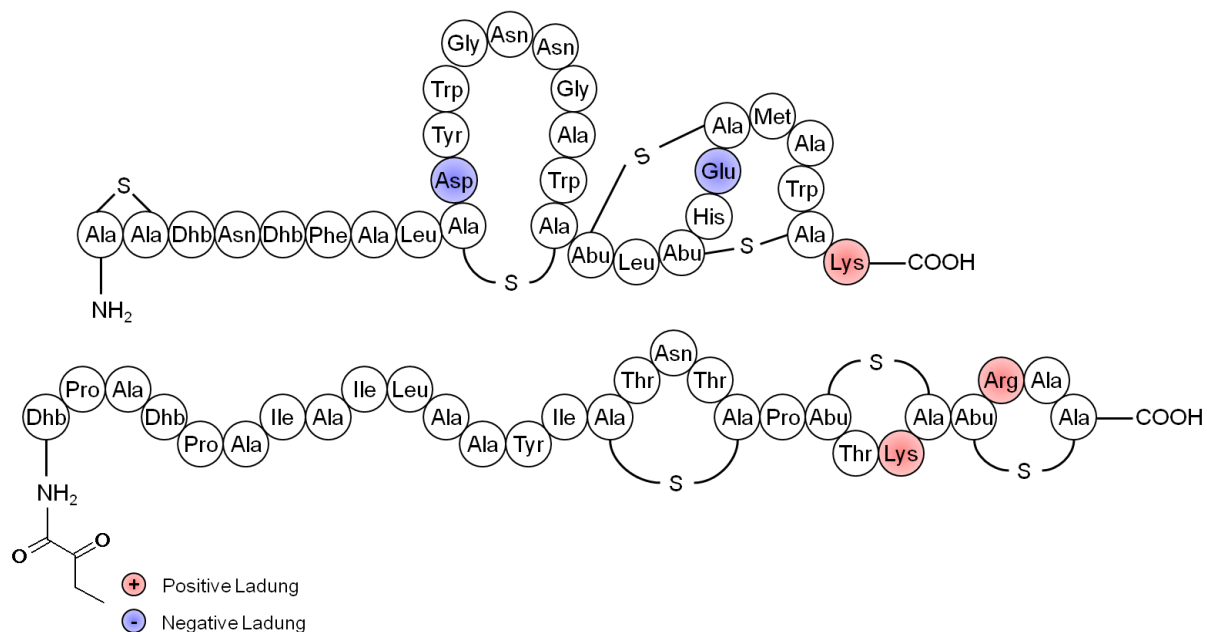


Abbildung 26: Strukturen des Zwei-Komponenten Lantibiotikums Lacticin 3147 A1 (oben) und A2 (unten). Das A1 Peptid wird zu den Typ B Lantibiotika gerechnet und hat eine einfache negative Nettoladung, während das A2 Peptid in die Typ A Gruppe eingeordnet wird und zweifach positiv geladen vorliegt.

Lacticin A1 und A2 werden von *Lactococcus lactis* DPC 3147 produziert [87]. In den Genclustern der Produzentenstämme sind zwei Strukturgene vorhanden, die beide jeweils ein Precursor-Molekül codieren. Beide Komponenten werden posttranslational modifiziert und unabhängig voneinander abgesondert. Lacticin A1 hat eine Länge von 30 AS und ein MW von 3322 Da. Es wird aufgrund seiner Struktur zu den Typ B Lantibiotika gerechnet. Es hat strukturelle Ähnlichkeit zum Mersacidin. Lacticin A2 besitzt 29 AS und hat ein MW von 2847 Da. Es zählt zu den Typ A Lantibiotika. Lacticin 3147 ist ebenfalls wirksam gegen grampositive Bakterien, wie *Lactococcus lactis*, *Listeria monocytogenes* und *Bacillus subtilis*.

Sahl et al. haben Permeabilitätsstudien mit Lacticin 3147 an Liposomen durchgeführt und postulieren folgendes Modell, das den Wirkmechanismus beschreibt [158]:

Lacticin A1 formt einen Komplex mit dem Zellwandprecursor Lipid II und hemmt damit bereits die Zellwandbiosynthese. Dann wird am A1 eine hochaffine Bindungsstelle für A2 generiert. Die Bindung des A2 daran führt zu einer Pore durch die Membran. Man vermutet, dass die Stöchiometrie des Komplexes A1:A2:Lipid II bei 4:4:4 liegt. Es wird daher angenommen, dass die entstehende Pore über einen kleineren Durchmesser verfügt als die Poren des Nisins mit Lipid II [159]. Ohne diesen geformten A1:Lipid II-Komplex ist A2 nicht in der Lage eine Pore zu bilden. Die volle Wirksamkeit ist erst durch Synergismus beider Moleküle gegeben. Dabei sinkt

die MIC bei Gabe gegen *Lactococcus cremoris* von 0.76 µg/mL (Lacticin A1 alleine) auf 0.006 µg/mL (Kombination) [158].

2.4. Glykopeptide

Eine wichtige Antibiotikaklasse bilden die Glykopeptide. Sie sind aus einer Peptidkette aufgebaut, die zusätzlich mit Zuckermolekülen verbunden ist. Zu den Glykopeptidantibiotika gehören unter anderem Vancomycin, Teicoplanin und Telavancin.

Tabelle 5: Einteilung wichtiger Glykopeptide.

Glykopeptid	Zugelassen	Mol. Gewicht	Produzentenstamm	Ref.
Vancomycin	1958	1450	<i>Amycolatopsis orientalis</i>	[160]
Teicoplanin	1992	1564-1907	<i>Actinoplanes teichomyceticus</i>	[161]
Telavancin	2009	1755	Semisynthetisch	[162]
Oritavancin	Nein	1793	Semisynthetisch	[163]
Dalbavancin	Nein	1755	Semisynthetisch	[164]

2.4.1. Vancomycin

Vancomycin war das erste Glykopeptidantibiotikum, das im Jahre 1956 entdeckt wurde. Es wurde aus dem Bodenbakterium *Amycolatopsis orientalis* isoliert [160]. Vancomycin ist ein Heptapeptid und hat ein Molekulargewicht von 1450 Da. Bei pH=7 trägt es eine positive Nettoladung. In der Peptidsequenz des Vancomycins tauchen zwei nicht-proteinogene Aminosäuren auf. Es handelt sich dabei um 4-Hydroxyphenylglycin (Hpg) und 3,5-Dihydroxyphenylglycin (Dhpg). An die AS Tyrosin ist zusätzlich eine β-Hydroxygruppe und ein Chloratom addiert. Eine Disaccharideinheit aus Glucose und Vancosamin ist O-glykosidisch an einem Hpg an Position 4 verbunden.

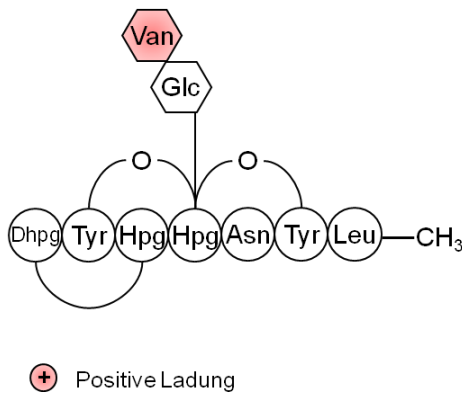


Abbildung 27: Struktur des Vancomycin. Ein Heptapeptid mit zwei nicht-proteinogenen AS Hpg und Dhpg sowie einer Disaccharideinheit aus Glucose und Vancosamin. Das Glykopeptid trägt eine positive Nettoladung. Die starre Struktur des Vancomycins ist bedingt durch Verzweigungen im Peptidgrundgerüst.

Die Struktur des Vancomycins wurde 1978 von Sheldrick und Mitarbeitern erstmals aufgeklärt [165]. Im Laufe der Zeit wurde die Struktur 1981 durch Williamson und Williams revidiert [166], weitere AS in der Peptidkette bestätigt [167], sowie 1996 eine Kristallstruktur vorgestellt [168].

2.4.2. Biosynthese des Vancomycins

Die Biosynthese des Vancomycins wird mit Hilfe nicht-ribosomaler Peptid-Synthasen (NRPS) bewerkstelligt [169]. Die Gene sind auf einem Gencluster codiert. Da das Biosynthesecenter des Vancomycins bis heute nicht beschrieben werden konnte, werden die gut erforschten Cluster der Strukturanaloga Chloroeremomycin und Balhimycin herangezogen. Diese haben das gleiche Peptidgerüst wie Vancomycin und unterscheiden sich lediglich im Glykosylierungsmuster. In den Clustern der Strukturanaloga sind 40 ORFs (engl. „Open Reading Frames“) vorhanden. An der Biosynthese sind proteinogene und die bereits erwähnten nicht-proteinogenen Aminosäuren beteiligt. Zunächst wird aus der AS Tyr mit Hilfe der Proteine CepJ, CepK und CepL das β -Hydroxytyrosin gebildet. Das sog. Prephenat, eine Vorstufe des Tyr, wird mittels mehrerer Enzyme schrittweise in Hpg umgewandelt. Dhpg wird aus Malonyl-CoA biosynthetisiert. Dabei kondensieren drei Malonyl-CoA Moleküle zu einem Ring. Nach Synthese der benötigten AS werden diese durch die NRPS zu einer Heptapeptidkette zusammengesetzt. Die NRPS sind aus drei Modulen (CepA, CepB und CepC) aufgebaut. Jedes Modul verfügt über eine Adenylierungsdomäne, die für die Erkennung der richtigen AS verantwortlich ist. Durch die PCP-Domäne (engl. „Peptidyl Carrier Protein“) werden die AS weitertransportiert. Außerdem gibt es

Kondensations- und Epimerisierungsdomänen in den NRPS. Das letzte Modul der NRPS enthält eine Thioesterase, die die Aufgabe hat, die Peptidkette durch Hydrolyse freizusetzen. Daraufhin finden Modifikationen an der synthetisierten Peptidkette statt. Die Tyrosine werden in ortho-Stellung zur phenolischen Hydroxygruppe mit Chloratomen halogeniert. Durch die oxidative phenolische Kopplung der Tyrosine an den Positionen 2 und 6 mit dem Hpg in Position 4 wird ein Triphenylether geformt. Die aromatischen Ringe an den Positionen 5 (Hpg) und 7 (Dhpg) sind direkt über eine Einfachbindung verknüpft. Die Verzweigungen zwischen den Peptiden führen zu einem sehr rigiden Peptidgrundgerüst. Der finale Schritt in der Modifikation ist die Methylierung des Heptapeptids am N-Terminus durch S-Adenosylmethionin. Damit ist die Synthese des Vancomycin-Aglykons beendet. Anschließend wird Vancomycin an Position 4 mit der Disaccharideinheit D-Glucose-L-Vancosamin glykosyliert. Durch ABC-Transporter wird das fertige Endprodukt ausgeschleust [169].

2.4.3. Wirkspektrum des Vancomycins

Vancomycin ist unter anderem wirksam gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* und multiresistente *Staphylococcus epidermidis* Stämme. Außerdem wird es eingesetzt bei Infektionen mit *Clostridium difficile*. Im gramnegativen Bereich wirkt es gegen *Neisseria gonorrhoeae*.

2.4.4. Wirkmechanismus des Vancomycins

Im Jahre 1965 zeigten Anderson und Strominger, dass Vancomycin die Zellwandbiosynthese inhibiert [170]. 1966 fanden Chatterjee et al. Hinweise auf den Wirkort des Vancomycins, nämlich die Pentapeptidkette, die in den Aufbau der bakteriellen Zellwand involviert ist [171]. Vancomycin bindet an das C-terminale D-Ala-D-Ala-Motiv der Pentapeptidbrücke des Lipid II und verhindert somit die Funktion der Transglykosylasen und Transpeptidasen in der Zellwandbiosynthese grampositiver Bakterien [165,172,173]. Es werden insgesamt fünf Wasserstoffbrücken zwischen dem Vancomycin und den Peptiden L-Lys-D-Ala-D-Ala des Lipid II ausgebildet. Als Wirkform des Vancomycins ist auch eine Dimerbildung in Diskussion [174]. Hierbei spielen die Zuckermoleküle eine große Rolle. Eine Membraninteraktion des Vancomycin ist aufgrund der sehr polaren Struktur nicht zu erwarten.

2.4.5. Einsatz des Vancomycins

Vancomycin wurde 1958 von der FDA als Vancocin® zugelassen [175]. In der Zwischenzeit gibt es unzählige Generika auf dem Markt. Da Vancomycin nicht aus dem Gastrointestinaltrakt resorbiert wird, muss es intravenös verabreicht werden. Eine orale Gabe ist bei Antibiotika-assoziiierter oder pseudomembranöser Enterokolitis indiziert. Der Haupterreger hierfür ist *Clostridium difficile*. Gefährliche Nebenwirkungen sind Oto- und Nephrotoxizität, weshalb häufig bei langfristiger Gabe ein Drug monitoring durchgeführt wird.

2.4.6. Resistenzen gegen Vancomycin

Es gibt zwei verschiedene Resistenzmechanismen. Ein Mechanismus stellt die Produktion einer dickeren Zellwand dar, die hauptsächlich in Vancomycin intermediären *Staphylococcus aureus* auftritt, welche dafür sorgt, dass Vancomycin an entfernte D-Ala Bausteine und nicht an Lipid II bindet. Die weitaus wichtigere Form der Resistenz ist die Synthese modifizierter Pentapeptide im Lipid II, die sich mit dem Austausch von D-Ala gegen D-Lac in Vancomycin resistenten *Staphylococcus aureus* ausdrückt [176]. Diese kleine Veränderung einer Aminosäure reicht bereits aus, um die Wirkung des Vancomycins deutlich abzuschwächen.

In den letzten Jahren kam es vermehrt zum Auftreten Vancomycin-resistenter Bakterienstämme und Vancomycin verlor die Rolle als Reserveantibiotikum an Linezolid.

2.4.7. Teicoplanin

Daher wurde weiter an Glykopeptiden geforscht und aus dem Fermentationprodukt von *Actinoplanes teichomyceticus* Teicoplanin als weiterer Vertreter eingeführt [161]. Es handelt sich bei Teicoplanin um ein Gemisch mehrerer Glykopeptide, die sich nur in einer Seitenkette unterscheiden. Das mittlere Molekulargewicht unterscheidet sich daher von Charge zu Charge. Die Struktur des Teicoplanins besteht demnach aus sieben Aminosäuren und drei Zuckerresten. Einer der Zucker trägt die jeweils unterschiedlichen Seitenketten [177]. Das Wirkspektrum entspricht dem des Vancomycins [178]. Einziger Vorteil des Teicoplanins ist die verlängerte Halbwertszeit von etwa 70 Stunden [179], die eine einmal tägliche Gabe begünstigt.

2.4.9. Wirkspektrum des Telavancins

Das Wirkspektrum erstreckt sich über MRSA und VRSA, die gegen Vancomycin und Teicoplanin bereits Resistenzen entwickelt haben. Telavancin ist von der FDA zugelassen bei Infektionen durch grampositive Erreger wie *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus anginosus* oder *Enterococcus faecalis* [180].

2.4.10. Wirkmechanismus des Telavancins

Der primäre Wirkmechanismus des Telavancin ist wie bei Vancomycin die Bindung an D-Ala-D-Ala. Jedoch ist die Verbindung auch in Vancomycin-resistenten Stämmen immer noch sehr wirksam. Als Grund für die verbesserte Wirkung wird die hydrophobe Seitenkette in Betracht gezogen [182]. Vermutlich dringt die Seitenkette in die Bakterienmembran ein und interagiert mit den Phospholipiden, während das Peptidgrundgerüst Lipid II bindet [183]. Mittels fluoreszenzmikroskopischer Messungen wurde die Anwesenheit des Telavancins im Bereich des Septums von *Staphylococcus aureus* nachgewiesen [184]. Neben der Blockade der Zellwandbiosynthese wird auch eine Störung der Membranintegrität durch die Interaktion des Antibiotikums mit der bakteriellen Membran diskutiert [185].

2.4.11. Oritavancin und Dalbavancin

Andere teilsynthetische Lipoglykopeptide wie Oritavancin [163] und Dalbavancin [164] sind noch in Phase III Studien und bislang steht eine Entscheidung über die Zulassung noch aus. Oritavancin unterscheidet sich von Vancomycin durch die Addition eines 4-Epivancosamin-Zuckers und einer sehr hydrophoben Chlorobiphenyl-Seitenkette [186]. Durch eine erhöhte Membranaffinität ist Oritavancin auch in Vancomycin-resistenten Stämmen wirksam [187]. Dalbavancin ist ein Teicoplanin-Derivat, dass eine sehr lange Halbwertszeit aufweist, die für eine einmal wöchentliche Gabe ausreicht [188]. Allerdings ist Dalbavancin nicht aktiv in Vancomycin-resistenten Bakterien, die eine VanA Resistenz haben [189,190].

2.4.12. Bisherige Biosensormessungen

Die Bindung des Vancomycin an D-Ala-D-Ala wurde bisher in einer QCM-Studie untersucht [191]. Das essenzielle Peptid D-Ala-D-Ala wurde chemisch mit einem flexiblen, wasserlöslichen Linker konjugiert. Das Ende des Linkers war kovalent mit einem langkettigen Alkanthiol verbunden, welches an der Goldoberfläche eines QCM-Quarzes immobilisiert wurde. Eine Konzentrationsreihe von Vancomycin wurde in einer Durchflussskammer vermessen. Dabei wurde ein K_D -Wert von $3.2 \mu\text{mol/L}$ berechnet. Eine Anlagerung von Vancomycin an L-Ala-L-Ala fand nicht statt.

Die Targetbindung des Vancomycins wurde auch mittels ITC untersucht [59]. Hierbei wurde nicht nur das Pentapeptid des Lipid II vermessen, sondern auch die dazugehörigen Zuckerbestandteile MurNAc und GlcNAc. Die Enthalpieänderungen und die Bindungskonstanten waren in allen Fällen sehr ähnlich. Dies ist ein Indiz für die Selektivität der Vancomycin-Targetbindung. Die Wechselwirkung zwischen Vancomycin und den Pentapeptid-Verbindungen war exotherm und hatte Bindungskonstanten im Bereich von $1.6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$.

2.5. Lipopeptide

Antibiotika aus der Klasse der Lipopeptide sind anionische Naturstoffe, die sich durch eine hohe Wirksamkeit gegen grampositive Erreger, wie MRSA, auszeichnen. Sie werden hauptsächlich durch *Actinoplanes* oder *Streptomyces* Arten produziert und werden ausschließlich nicht-ribosomal synthetisiert. Ihr struktureller Aufbau ist gekennzeichnet durch die Anwesenheit unüblicher Aminosäuren, die als Peptidgrundgerüst einen 7 bis 10 gliedrigen Ring bilden, und einer lipophilen Fettsäure-Seitenkette, die gesättigt oder auch ungesättigt vorliegen kann [192]. Man kann die Lipopeptide in zwei große Gruppen kategorisieren: Die zyklischen Lipodepsipeptide und die zyklischen Lipopeptide. Während in den Lipodepsipeptiden der zyklische Peptidring durch einen Carbonsäureester geschlossen wird, ist bei den Lipopeptiden die Zyklisierung durch ein Carbonsäureamid realisiert. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über einige wichtige Lipopeptide:

Tabelle 6: Einteilung wichtiger Lipopeptide.

Lipopeptid	Gruppe	Mol. Gewicht	Produzentenstamm	Ref.
Daptomycin	Lipodepsipeptid	1620	<i>Streptomyces roseosporus</i>	[193]
CDA	Lipodepsipeptid	1480-1576	<i>Streptomyces coelicolor</i>	[194]
Amphomycin	Lipopeptid	1290	<i>Streptomyces canus</i>	[195]
Laspartomycin	Lipopeptid	1246	<i>Streptomyces viridochromogens</i>	[196]
Friulimicin	Lipopeptid	1303	<i>Actinoplanes friuliensis</i>	[197]
Tsushimycin	Lipopeptid	1304	<i>Streptomyes griseoflavus</i>	[198]

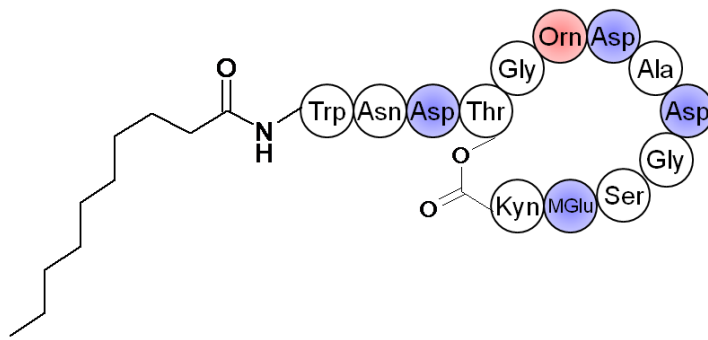
Die Erforschung dieser Antibiotikaklasse begann in den 1950er Jahren. Als erstes Lipopeptid wurde 1953 Amphomycin entdeckt [195]. Laspartomycin und Tsushimycin wurden 1968 beschrieben [196,198]. CDA (engl. „Calcium Dependent Antibiotic“) wurde 1983 von Lakey et al. charakterisiert [194]. Daptomycin kam in den 1980er Jahren hinzu [193]. Der erste Artikel über Friulimicin datiert aus dem Jahr 2000 [197].

Die Lipopeptide zeigen eine große strukturelle Vielfalt. Anhand der wichtigsten Vertreter Daptomycin und Friulimicin werden im folgenden Kapitel beispielhaft die Biosynthese, strukturelle Aspekte und der Wirkmechanismus beschrieben.

2.5.1. Daptomycin

Daptomycin wurde 1986 von Eliopoulos und Mitarbeitern noch als Verbindung LY 146032 des Faktors A21987C isoliert und anschließend aus dem Fermentationsprodukt von *Streptomyces roseosporus* gewonnen [193]. Die Produktion von Daptomycin konnte durch Zugabe von Dekansäure zur Fermentation gesteigert werden [199]. Bereits die ersten Ansätze des Daptomycins zeigten eine gute Wirkung bei grampositiven Erregern, wie Staphylokokken, Streptokokken und Enterokokken [200]. Bei den MIC-Bestimmungen wurde besonders die Calciumabhängigkeit der Wirkung erkannt [193,201]. Die Anwesenheit von Calcium im Medium führte zu einer geringeren MIC bei sonst gleichen Bedingungen.

Daptomycin hat ein Molekulargewicht von 1620 Da und besteht aus 13 Aminosäuren, die einen Dekapeptidlaktonring bilden. Drei exozyklische AS verbleiben außerhalb der Ringstruktur und sind mit einer gesättigten Dekanfettsäurekette verbunden. Zu den unüblichen, nichtproteinogenen AS des Daptomycins zählen Ornithin (Orn), Kynurenin (Kyn) und 3-Methylglutaminsäure (MGlu). Zwischen Kyn und Thr ist eine Esterbrücke, die den Makrozyklus bildet.



⊕ Positive Ladung

⊖ Negative Ladung

Abbildung 29: Struktur des Daptomycin. Der Makrozyklus besteht aus 10 Peptiden, die durch ein Laktone verbunden sind. An die Position 1 ist eine Dekanfettsäure angehängt. Die Verbindung hat eine dreifach negative Nettoladung.

Der Peptidring ist größtenteils hydrophil aufgebaut mit vier geladenen AS (Orn, Asp, MGlu). Durch die lipophile Seitenkette (Dekanoyl) erhält die sonst polare Struktur einen amphiphilen Charakter.

2.5.2. Biosynthese des Daptomycins

Die Biosynthese des Daptomycins wird durch drei NRPs durchgeführt. Daran sind beteiligt: DptA, DptBC und DptD. Zwei kleinere Proteine DptE und DptF, die durch die Gene *dptE* und *dptF* codiert werden sind an der Aktivierung und Kopplung der Fettsäurekette an das N-terminale Trp beteiligt und initiieren somit die Biosynthese. Die Module enthalten neben Adenylierungs-, Kondensations- und Epimerisierungsdomänen auch eine PCP-Einheit und eine Thioesterase. Das Gen *dptA* codiert für die ersten fünf Module DptA (684 kDa). Es ist zuständig für die Synthese der AS-Abfolge Trp1-Asn2-Asp3-Thr4-Gly5. Durch das Gen *dptBC* wird DptBC (815 kDa) gebildet. Es führt die Peptidkette fort, indem es die Peptide mit der Sequenz Orn6-Asp7-Ala8-Asp9-Gly10-Ser11 synthetisiert. DptD (265 kDa), aus dem Gen *dptD*, fügt die Module MeGlu12-Kyn13 hinzu. Das Modul 12 aktiviert eine Methyltransferase mit der Glu methyliert wird. Im letzten Schritt wird eine Verknüpfung zwischen Kyn13 und Thr4 über einen Ester erstellt und durch die Thioesterase-Domäne wird das fertige Endprodukt durch Hydrolyse freigesetzt [202].

2.5.3. Einsatz des Daptomycins

2003 wurde Daptomycin (Cubicin®) von der FDA zur Behandlung komplizierter Haut- und Weichteilinfektionen zugelassen, die durch grampositive Erreger verursacht wurden. 2006 wurde die Indikation des Daptomycins erweitert auf rechtsseitige, durch *Staphylococcus aureus* infektiöse Endokarditis. Häufige Nebenwirkungen sind Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen. Eine gefährliche Nebenwirkung ist die muskuläre Toxizität, die durch eine mindestens zweimal tägliche Gabe bei längerer Anwendung ausgelöst werden kann.

2.5.4. Wirkmechanismus des Daptomycins

Der Wirkmechanismus von Daptomycin ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Als gesichert gilt die Tatsache, dass die antimikrobielle Aktivität von Calciumionen abhängig ist [193,201]. Aber auch andere divalente Kationen, wie Magnesium haben einen Einfluss auf die MIC [203]. Auffallend ist die konservierte Sequenz „Asp-[]-Asp-Gly“, die in vielen Lipopeptiden vorkommt, und die in die Bindung des Calciumions involviert sein könnte [202].

Eine der ersten Studien zum Wirkmechanismus stammt von Silverman et al. [204]. Dabei wurde die Korrelation zwischen dem Membranpotential und der bakteriziden Wirkung des Daptomycin aufgestellt. Als Mechanismus wurde ein Modell angenommen, bei dem Daptomycin calciumabhängig in die bakterielle Membran inseriert, oligomerisiert und die funktionelle Integrität der Bakterienmembran stört. Dabei wird die Membran zerstört, intrazelluläre Ionen strömen aus und führen so zum Zelltod.

Ein Jahr später schlugen Jung und Hancock, hergeleitet aus NMR, CD-Spektroskopie und fluoreszenzspektroskopischen Beobachtungen, ein anderes Modell mit einem zwei-stufigen Mechanismus vor [205]. Im ersten Schritt bindet Calcium an Daptomycin und verursacht eine konformationelle Änderung, erhöht die Amphiphilie und schwächt den Effekt der anionischen Ladung ab. Als Folge der strukturellen Veränderung bilden sich Oligomere, die sich dann mizellartig formieren und in der Lage sind, mit aciden oder neutralen Phospholipidbestandteilen von Zellmembranen zu interagieren. Darin besteht auch der zweite Schritt, nämlich der Brückenfunktion des Calciums zwischen negativ geladenen Phospholipiden und der negativen Ladung des Daptomycins. Damit geht laut CD-Spektroskopie eine zweite Konformations-

änderung einher, die auf eine tiefere Membraninsertion zurückgeführt wird. Aber auch dieses Modell wurde in manchen Punkten als unzureichend bewertet. Scott et al. konnten nachweisen, dass Daptomycin vor der Membraninsertion keine Konformationsänderung eingeht [206].

Daraufhin haben Straus und Hancock 2006 einen revidierten Wirkmechanismus vorgestellt [207]. Die calciumabhängige Oligomerisierung des Daptomyocins als 14-16mer in Mizellenform wurde beibehalten. Neu war die Annahme, dass diese Mizellen als Vehikel fungieren, die Daptomycin zur Oberfläche der bakteriellen Membran transportieren. Erst bei einer hohen Lokalkonzentration dissoziieren Daptomycinmoleküle aus den Mizellen in die Membran unter Zuhilfenahme des hydrophoben Lipidschwanzes. Die Bildung von Oligomeren in der Membran führt dann letztlich zu einer Depolarisierung der Membran. Hobbs et al. haben aber demonstriert, dass die gemessenen Membrandepolarisationen und der Kaliumausstrom nicht die Ursache, sondern die Folge des Zelltods in *Staphylococcus aureus* darstellt [208]. Aus Transkriptomanalysen hat man herausgefunden, dass Daptomycin einen Zellwandstress-Stimulus indiziert [209].

Ein neuer interessanter Ansatz zum Wirkmechanismus wurde von Baltz eingeführt [210]. YycG ist eine membranassoziierte Histidinkinase und fungiert als Regulationssystem für den Zellwandmetabolismus und der Formation eines Biofilms [211]. Eine erhöhte Expression des YycG und der zweiten Komponente YycF in *S. aureus* führten zu einer verstärkten Peptidoglykanbiosynthese. Eine Erniedrigung von YycFG brachte dagegen den Zelltod ohne Lyse. YycG ist in *Bacillus subtilis* im Bereich des Zellseptums lokalisiert [212] und spielt eine Rolle bei der Zellteilung [213]. Baltz vermutet, dass eine mögliche Targetierung des YycG durch Daptomycin die gleichen Folgen haben könnte wie eine funktionelle Downregulation des YycG. Dann vergleicht er diese Folgen mit beschriebenen Daptomycin Effekten, wie Zelltod ohne Lyse [214], Inhibierung von Biofilmproduktion [215], seltsame Zellverformungen [214]. Zusätzlich ist Daptomycin in Phosphatidylglycerolreichen Regionen anzutreffen [216]. In diesen Bereichen ist YycG in *Bacillus subtilis* anzutreffen. Somit könnte Daptomycin neben der calciumabhängigen Membraninteraktion auch die Inhibition der YycG vermittelten Signaltransduktionskaskade als primären Wirkmechanismus aufweisen [210].

2.5.5. Friulimicin

Das Lipopeptid Friulimicin ist ein relativ neuer Vertreter dieser Antibiotikaklasse und wird aus *Actinoplanes friuliensis* isoliert. Es ist sehr wirksam gegen MRSA, Enterokokken und einige Anaerobier. Beschrieben wurde Friulimicin erstmals von Vertesy und Mitarbeitern im Jahr 2000 [197]. Es handelt sich um ein Peptid, das aus einem Dekapeptidring mit einer exozyklischen AS besteht, die eine ungesättigte und verzweigtkettige Fettsäure trägt. Auch hier entdeckt man ungewöhnliche AS wie 2,3-Diamminobuttersäure (Dab), Pipecolinsäure (Pip) und Methylasparagin (MAsp). Der Makrozyklus ist durch eine Peptidbindung zwischen Dab2 und Pro11 geschlossen.

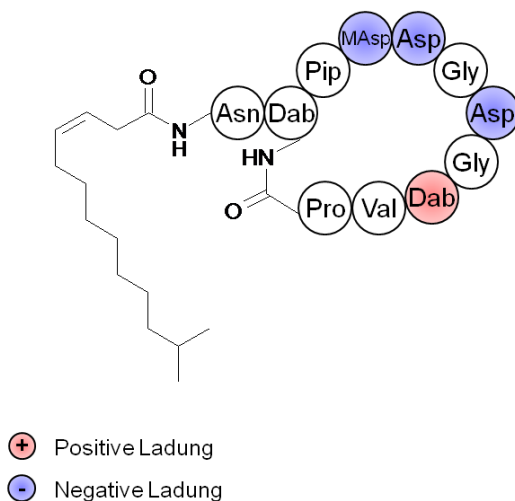


Abbildung 30: Struktur des Friulimicin. Der Makrozyklus besteht aus 10 Peptiden. An die Position 1 ist eine ungesättigte iso-tetradecenoyl-Fettsäure angehängt. Die Verbindung hat eine zweifach negative Nettoladung.

Friulimicin ist ein amphiphiles Molekül, das eine polares Peptidgerüst und eine hydrophobe Seitenkette trägt. Auch hier ist die für die Calciumbindung notwendige AS-Abfolge „Asp-[]-Asp-Gly“ in der Peptidsequenz konserviert.

2.5.6. Biosynthese des Friulimicins

Die Biosynthese des Friulimicins wurde schrittweise durch die Arbeitsgruppe von Schwartz beschrieben [217-219]. Die NRPs PstA, PstB, PstC und PstD sind für die Synthese des Lipopeptids verantwortlich. PstA enthält ein Modul und bildet Asn1. PstB synthetisiert die beiden Peptide Dab2-Pip3. PstC hat sechs Module, die für die Fortführung der Kette MAsp4-Asp5-Gly6-Asp7-Gly8-Dab9 aufbaut. Durch PstD werden Val10-Pro11 produziert. Außerdem sind Proteine vorhanden, die für die

Synthese der ungewöhnlichen AS MAsp (GlmA, GlmB), Dab (DabA, DabB, DabC), Pip (Pip) zuständig sind. Die lipophile Seitenkette wird durch LipA und LipB synthetisiert und an das Peptidgrundgerüst angefügt. Durch den ABC-Transporter ExpB wird das fertige Endprodukt ausgeschleust [192,219].

2.5.7. Einsatz des Friulimicins

Friulimicin ist trotz vielversprechender Wirkung gegen resistente grampositive Erreger nicht zugelassen worden. Eine Phase I-Studie aus dem Jahr 2007 wurde wegen ungünstiger Pharmakokinetik abgebrochen [220]. Es handelte sich um eine randomisierte, doppelblinde Studie an gesunden Probanden. Primäre Outcome-Parameter waren die Sicherheit und Verträglichkeit von einzelnen und multiplen intravenösen Applikationen von Friulimicin.

2.5.8. Wirkmechanismus des Friulimicins

Tsushimycin [198] ist ein Strukturanalogon des Friulimicins. Beide Lipopeptide unterscheiden sich nur durch eine AS an Position 1. Während Friulimicin ein Asn1 trägt, hat Tsushimycin ein Asp1. Durch Kristallstrukturanalysen an Tsushimycin konnte gezeigt werden, dass die Wirkform ein Dimer ist, welches sich in Anwesenheit von Calcium bildet [221]. Da der Unterschied zwischen beiden Strukturen lediglich in einer AS besteht, die exozyklisch außerhalb der vermuteten Calciumbindungsstelle liegt, wird ein ähnliches Verhalten auch für Friulimicin erwartet.

Schneider et al. haben die molekulare Zielstruktur des Friulimicins identifiziert [222]. Es handelt sich um eine Vorstufe des Zellwandbestandteils Lipid II, das sog. Baktoprenolphosphat (C55P). Auf das Membranpotential hat Friulimicin keinen Einfluss. Auch wird die Membran in Anwesenheit des Lipopeptids nicht zerstört. Die Bindung von Friulimicin an die Zielstruktur C55P erfolgt in einem stöchiometrischen Verhältnis von 2:1. Für das Bindungsmodell schlagen Schneider et al. einen Mechanismus vor, der an die Kristallstruktur des Tsushimycins anlehnt. Durch Calcium bildet sich ein Friulimicin-Dimer mit hydrophilen und hydrophoben Bereichen. Durch eine ladungsinduzierte Wechselwirkung bindet das Dimer die Phosphatgruppe des C55P und inhibiert die Zellwandbiosynthese und die Lipoteichonsäuresynthese.

Die Rolle der Calciumionen an der Bindung des Friulimicin an C55P wurde von Reder-Christ et al. in einer Modellmembranstudie untersucht [223]. Dabei konnten neue Einblicke in den molekularen Wirkmechanismus des Friulimicins gewonnen werden. C55P wurde mittels kinetischer Daten aus Biosensormessungen an der QCM als Zielstruktur des Friulimicin bestätigt. Die Phosphatgruppe des C55P scheint eine essentielle Funktion für die Bindung des Friulimicins zu haben. Calcium überbrückt die negative Ladung des C55P und des Friulimicins und hat so einen entscheidenden Einfluss auf den Bindungsprozess. Aus den AFM-Aufnahmen dieser Studie erkennt man keinen deutlichen Effekt des Calciums auf die Aggregation des Friulimicins an die Oberfläche der Modellmembran. Die Ergebnisse der CD-Spektren lassen darauf schließen, dass Friulimicin eine konformationelle Änderung durch Calcium erfährt.

2.6. Neue Ansätze in der Antibiotikaforschung

Aufgrund der Resistenzproblematik sind neue Wege zur Bekämpfung resistenter Keime notwendig, die sich insbesondere auch auf die strukturelle Modifikation bekannter Wirkstoffe richten. Zu diesen gehören beispielsweise die Erzeugung von Hybridmolekülen und die Einführung von lipophilen Strukturelementen in polare Antibiotikagrundgerüste. Exemplarisch werden an dieser Stelle zwei Varianten von Hybridmolekülen vorgestellt.

Die Kombination eines Glykopeptids mit einem Lantibiotikum ist in der Lage, die Wirksamkeit in Vancomycin-resistenten Enterokokken wiederherzustellen. Ein Hybrid aus Vancomycin und Nisin wurde von Arnusch und Mitarbeitern getestet [224]. Beide Antibiotika targetieren Lipid II an unterschiedlichen Domänen und die Autoren gehen von einer bivalenten Wirkverstärkung des Hybridmoleküls aus.

Ein zweiter Ansatz behandelt die Kombination eines Antibiotikums mit einem hydrolytisch wirksamen Enzym. Dabei wurde Vancomycin mit einer tetravalenten Metallohydrolase verknüpft [225]. Eine Lipid II-haltige Modellmembran wurde durch diese Verbindung hydrolysiert.

Diese Studien belegen, dass auch bereits vorhandene Wirkprinzipien in effektiver Weise kombiniert werden können, um gegen resistente Erreger vorzugehen.

2.7. Zielsetzung der Arbeit

Neben der spezifischen Bindung an Zielstrukturen zeigen Antibiotika auch unspezifische Wirkungsweisen, die oftmals aus der Interaktion mit der bakteriellen Membran entspringen. Deren Anteil lässt sich unter in vivo Bedingungen nur ungenügend erfassen. Vielversprechend sind hingegen Modellmembransysteme in Kombination mit geeigneten analytischen Methoden, um das Zusammenspiel von spezifischen und unspezifischen Wirkweisen an der bakteriellen Membran zu simulieren.

In dieser Arbeit werden verschiedene Methoden angewendet und etabliert, um die Wirkungsweise unterschiedlicher Antibiotika auf der Ebene von Modellmembransystemen zu simulieren und näher zu charakterisieren.

In bisherigen Untersuchungen zu Gallidermin wurden mit den Biosensortechniken QCM und CV wichtige Postulate der molekularen Wirksamkeit dieses Lantibiotikums aufgestellt [40]. Von besonderer Bedeutung war dabei, dass die Membran einen großen Einfluss auf die Bindung des Lantibiotikums zeigt. Allerdings überlagerte die hohe Membranaffinität die analytische Detektion der Targetierung des Lipid II.

Ein Ziel der Arbeit ist die erstmalige Aufklärung der Membraninteraktion des Gallidermins mittels ITC und der Vergleich der so detektierten Wechselwirkungen mit anderen Lipid II-Bindern wie Vancomycin und Telavancin. Darüber hinaus sollen der Bindungsverlauf und die Rolle der Zielstruktur Lipid II konzentrationsabhängig mit der sensitiven SAW-Methode an Modellmembranen betrachtet und ausgewertet werden.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Arbeit beinhaltet die Untersuchung von ladungsabhängigen Interaktionen der Lipopeptide Friulimicin und Daptomycin mit Modellmembranen. Hierzu werden ebenfalls zum ersten Mal ITC-Messungen vorgenommen.

Insgesamt sollen mit diesen Biosensortechniken weitere Einblicke in die Membranwechselwirkung und den molekularen Wirkmechanismus der Peptidantibiotika zur Gewinnung differenzierter Aussagen über die antimikrobielle Aktivität erreicht werden. Zu klären ist dabei, ob unterschiedliche membranäre Effekte, wie z.B. die Anlagerung, Inserierung und Porenbildung voneinander abgrenzbar detektierbar sind und welchen Beitrag diese Prozesse zur Gesamtwirksamkeit leisten.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Messgeräte

Tabelle 7: Verwendete Messgeräte.

Geräte	Hersteller
E-QCM CHI-430	CH-Instruments, Austin, Texas, USA
LS 55 Luminescence Spectrometer	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA
QCM LiquiLab 21	IfAK e.V. , Barleben, BRD
VP-ITC	Microcal, Northampton, USA
SAW S-Sens K5 Biosensor	Biosensor GmbH, Bonn, BRD

3.1.2. Substanzen

Tabelle 8: Vermessene Peptidantibiotika.

Substanzen	Bezugsquelle
Daptomycin	IMMIP Universität Bonn, Bonn, BRD
Friulimicin	IMMIP Universität Bonn, Bonn, BRD
Gallidermin	Genmedics GmbH, Reutlingen, BRD
Nisin	IMMIP Universität Bonn, Bonn, BRD
Telavancin	Astellas Pharma Global Development, Inc., Deerfield, USA
Vancomycin	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD

3.1.3. Lipide

Tabelle 9: Verwendete Phospholipide und Zellwandvorstufen.

Lipide	Bezugsquelle
C55P	Larodan, Malmö, Schweden
DOPC	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD
DOPG	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD
Lipid II	IMMIP Universität Bonn, Bonn, BRD

3.1.4. Chemikalien

Tabelle 10: Eingesetzte Chemikalien und ihre Bezugsquellen.

Chemikalien	Bezugsquelle
Aceton	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
11-Aminoundecanthiol	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD
Calciumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD
Essigsäure 99,8 %	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, BRD
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Ethanol absolut	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, BRD
Hexadecanthiol	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, BRD
Kaliumchlorid	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, BRD
Kaliumdihydrogenphosphat	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, BRD
Kaliumhexacyanoferrat-(III)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD
Merocyanin MC 540	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, BRD
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, BRD
Millipore Typ 2	Millipore GmbH, Schwalbach, BRD
Natriumchlorid	Grüssing GmbH Analytika, Filsum, BRD
Natriumsulfat-Decahydrat	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, BRD
Poly-L-Lysin	AppliChem GmbH, Darmstadt, BRD
2-Propanol 99,99 %	Fluka Chemie AG, Neu-Ulm, BRD
Schwefelsäure 95 - 97 %	KMF Laborchemie Handels GmbH, Lohmar, BRD
SDS	AppliChem GmbH, Darmstadt, BRD
Tris	Acros Organics, Geel, Belgien
Wasserstoffperoxid 35 %	Merck KGaA, Darmstadt, BRD

3.1.5. Sonstige Materialien

Tabelle 11: Sonstige Materialien und ihre Bezugsquellen.

Material	Bezugsquelle
Analysenwaage Sartorius Basic	Sartorius AG, Göttingen, BRD
Autosizer 2C PCS	Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, BRD
Autosizer 7032 Multi 8 Correlator	Malvern Instruments GmbH, Herrenberg, BRD
CV Quarzsensoren	CH-Instruments, Austin, Texas, USA

Material	Bezugsquelle
Glasperlen 2.5 mm Biospec Products	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD
Hamilton Spritzen	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Isopore Filter 0.1 µM	Millipore GmbH, Schwalbach, BRD
Kälte-Umwälzthermostat F25-ED	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, BRD
Langmuir-Blodgett Filmwaage	Riegler & Kirstein, Berlin, BRD
Lift	Mayer Feintechnik, Göttingen, BRD
Lipex Basic Extruder	Northern Lipids, Burnaby, Kanada
Magnetrührer MR 3001	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, BRD
Mikrozentrifuge	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, BRD
Orbitalschüttler KS 15	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, BRD
pH Meter inlab routine	Mettler Toledo GmbH, Giessen, BRD
Präzisionsküvetten 10 mm Suprasil	Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, BRD
Rotavapor R Rotationsverdampfer	Büchi Labortechnik GmbH, Essen, BRD
Vacuubrand Vakuumpumpe	Vacuubrand GmbH & Co. KG, Wertheim, BRD
QCM Quarzsensoren	IfAK e.V., Barleben, BRD
SAW Quarzsensoren	Biosensor GmbH, Bonn, BRD
Thermovac	Microcal, Northampton, USA
Ultraschallbad Bandelin Sonorex	Schalltec GmbH, Mörfelden-Walldorf, BRD
Vortexer MS1 Minishaker	Ika Works Inc., Wilmington, USA

3.2. Methoden

3.2.1. Charakterisierung der Quarzsensoren

QCM-Quarzsensoren sind runde Scheiben, die einen Durchmesser von 14 mm aufweisen. Die Quarzkristalle wurden im sog. AT-Cut geschnitten. Dies entspricht einem Schnittwinkel von $35^{\circ} 10'$ zur optischen Achse. Auf der Ober- und Unterseite sind Goldelektroden aufgedampft. Die aktive Sensorfläche ist mit 28 mm^2 angegeben. Die Resonanzfrequenz des QCM-Quarzes beträgt 10 MHz.

CV-Quarzsensoren haben einen Durchmesser von 13.7 mm und sind ebenfalls rund. Die Goldelektroden sind mit einer Halterung verbunden. Die aktive Sensorfläche beträgt bei den CV-Quarzen 15.7 mm^2 . Die Resonanzfrequenz liegt hier bei 8 MHz.

SAW-Quarzsensoren haben eine Länge von 19 mm, eine Breite von 14 mm und bestehen aus fünf identischen Sensorelementen mit einer sensitiven Fläche von $3 \times 2.1 \text{ mm}^2$ pro Element. Die Quarze wurden in einem Schnittwinkel von 42.75° zur optischen Achse verarbeitet (sog. ST-Cut). Auf der Oberseite sind ebenfalls Goldelektroden angebracht. Die Resonanzfrequenz erreicht hier Werte zwischen 140 und 150 MHz.

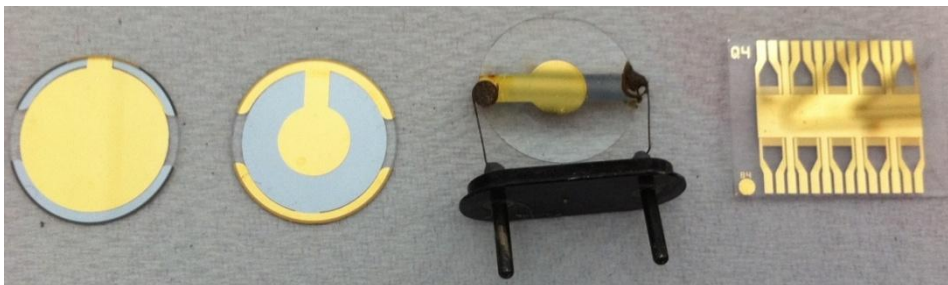


Abbildung 31: Von links nach rechts sind die Ober- und Unterseite eines QCM-Quarzes, ein CV-Quarz und ein SAW-Quarz im Größenvergleich abgebildet.

3.2.2. Reinigung der Quarzsensoren

Zunächst wurde die Caro'sche Lösung aus einem Teil Wasserstoffperoxid und drei Teilen konzentrierter Schwefelsäure in einem Erlenmeyerkolben hergestellt. Aufgrund der auftretenden Hitzeentwicklung wurde der Ansatz mit Eiswasser gekühlt. Das aktive Agens ist die Peroxomonoschwefelsäure, die in der folgenden Reaktionsgleichung dargestellt ist:



Durch die Behandlung der verwendeten Quarzsensoren mit der Caro'schen Lösung werden die Gold-Thiol-Bindungen zwischen den Monolayerschichten und den Goldatomen auf den Quarzoberflächen abgelöst und die Sensoren können nach dieser Prozedur wiederverwendet werden.

Die Oberfläche der Quarzsensoren wurde mit Caro'scher Lösung überdeckt. Nach einer bestimmten Einwirkzeit wurde der Quarz mit Milliporewasser abgespült und die Prozedur entsprechend der Quarzart wiederholt.

In folgender Tabelle sind die Reinigungsprotokolle für die unterschiedlichen Quarzsensoren aufgeführt:

Tabelle 12: Reinigungsprotokolle für QCM-, CV- und SAW-Quarze.

Prozedur	QCM	CV	SAW
Caro'sche Lsg	3 x Oberseite	6 x eingetaucht	2 x Oberseite
Einwirkzeit [sec]	180	10	120
Millipore	✓	✓	✓
Druckluft	✓	✓	✓
Aceton			✓
Ethanol			✓
Druckluft			✓
Caro'sche Lsg	3 x Unterseite		1 x Oberseite
Einwirkzeit [sec]	180		120
Millipore	✓		✓
Ethanol	✓	✓	✓
Druckluft	✓	✓	✓

3.2.3. Beschichtung der Quarzsensoren

Die gereinigten QCM- und CV-Quarze wurden bei Raumtemperatur über Nacht in eine 10 mM Hexadekanthiol-Lösung, die in Chloroform gelöst wurde, eingelegt. Dabei kam es nach dem Prinzip des „self-assembling“ zur Ausbildung einer definierten Monolayerschicht auf der Quarzoberfläche durch kovalente Bindungen zwischen den Schwefelatomen der Thiollösung und den Goldatomen auf der Oberfläche der Quarze.

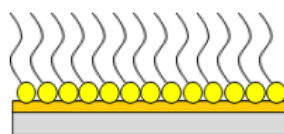


Abbildung 32: Quarzsensor mit einer Monolayerschicht, die durch self-assembling entstanden ist.

Zum Aufbau eines Bilayers wurde die Langmuir-Blodgett Technik eingesetzt. Auf die Oberfläche eines mit Milliporewasser gefüllten Teflontroges wurden 5 μL DOPC-Lösung \pm 5 μL Lipid II-Lösung mit Hilfe einer Mikroliterspritze aufgespreitet.

Die Konzentrationen der Phospholipid-Stammlösungen betrugen 10 mM. Als Lösungsmittel kam Chloroform zum Einsatz. Nach 30 min Wartezeit wurde der Film mittels einer beweglichen Barriere automatisch auf einen zuvor bestimmten Lateraldruck zusammengefahren. Der Quarz wurde aus der Hexadekanthiol-Lösung entnommen, kurz mit Ethanol abgespült, an einer Klammer befestigt und mit Hilfe eines Liftes senkrecht zur Wasser-Luft-Grenzfläche des Troges in den komprimierten Film eingetaucht. Durch van-der-Waals Wechselwirkungen zwischen den lipophilen Ketten der Phospholipide und den Alkylketten der Alkanthiole entstand eine unsymmetrische Doppelschicht auf der Oberfläche des Quarzes:

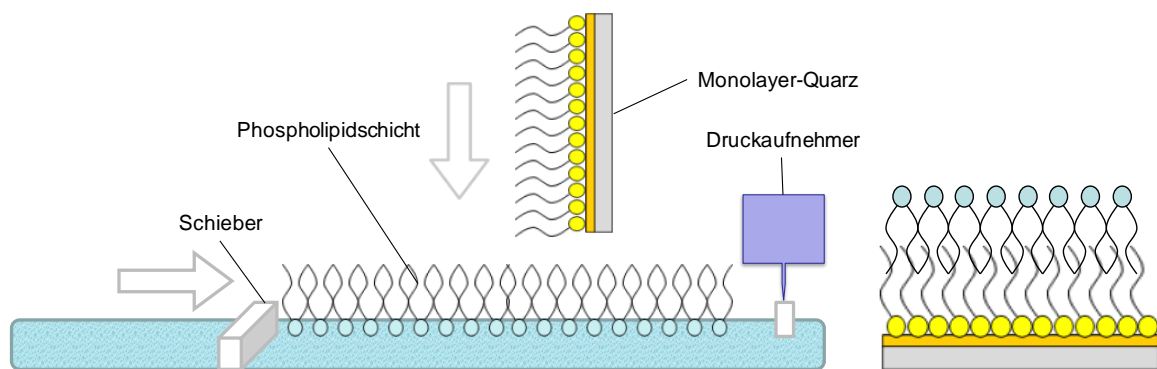


Abbildung 33: Langmuir-Blodgett Technik zur Übertragung einer Phospholipidschicht auf einen Quarz (links) und Ausbildung eines unsymmetrischen Bilayers auf einer Quarzsensoroberfläche (rechts).

Nach Absaugen der restlichen Lipide auf dem Trog wurde der beschichtete Quarz in wässriger Umgebung in die jeweilige Messzelle eingebaut (Abb. 34).

Dabei ist bei den QCM-Messzellen insbesondere auf die richtige Lage der Quarze und der Kontaktringe zu achten.

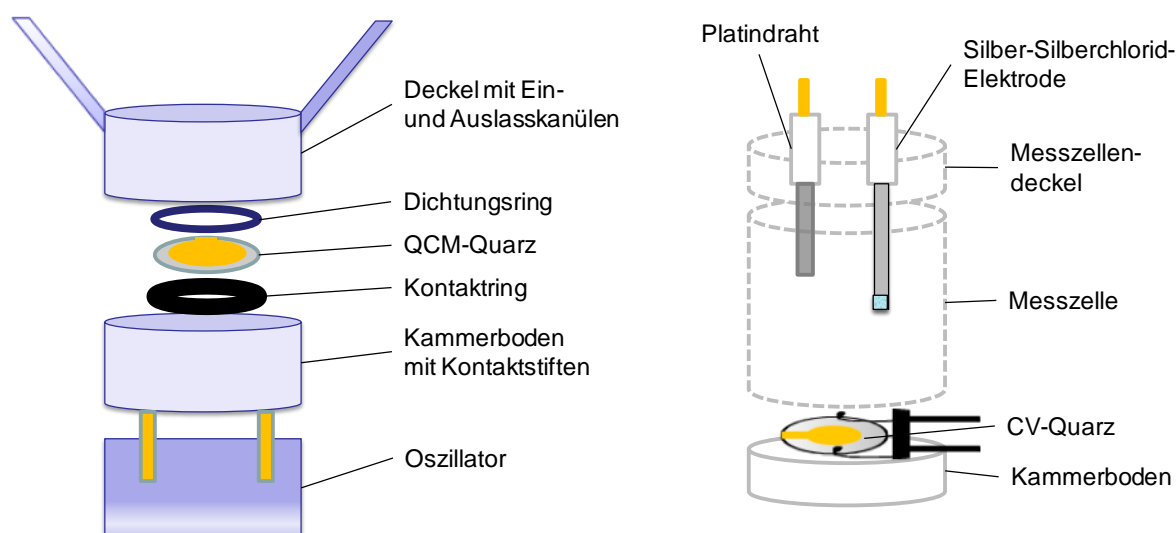


Abbildung 34: Aufbau der QCM-Messzelle (links) und CV-Messzelle (rechts).

Die zusammengebauten Messzellen wurden dann im Luftstrom getrocknet, um eine Kurzschlussreaktion bei Anschluss an die Hauptgeräte zu vermeiden.

Die SAW-Sensoren wurden bei Raumtemperatur für zwei Tage in eine 0.5 mM ethanolische Mercaptoundecylamin-Lösung eingelegt. Am Messtag wurde der SAW-Quarz aus der Lösung entnommen, mit Ethanol abgespült und mit synthetischer Luft abgetrocknet. Darauf wurde der Quarz in einen Glasbehälter mit absolutem Ethanol eingelegt und für drei Minuten in ein Ultraschallbad gesetzt. Nach abschließender Trocknung wurde der Quarz in die SAW-Messzelle eingebaut.

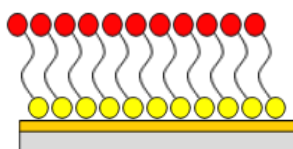


Abbildung 35: SAW-Quarz mit Mercaptoundecylaminschicht.

3.2.4. Liposomenherstellung

Die eingesetzten Liposomen wurden nach der Hydratationsmethode hergestellt.

In einen 10 mL Rundkolben wurden für die ITC-Messungen 150 μmol DOPC, für die SAW-Messungen 5 μmol DOPC eingewogen und mit ca. 5 mL Chloroform gelöst. Danach wurden nach Bedarf 10 mol% DOPG und/oder 0.1 mol% Lipid II bzw. 0.1 mol% C55P hinzugefügt. Das Chloroform wurde am Rotationsverdampfer bei 40°C Wasserbadtemperatur für fünf Minuten bei 240 mbar, fünf Minuten bei 200 mbar und zuletzt bei 15 mbar für mindestens eine Stunde abrotiert. Danach wurden fünf Glaskügelchen und genau 5.0 mL Milliporewasser mit einer Vollpipette

hinzugegeben und der Ansatz wurde für ca. 30 Sekunden mechanisch in einem Vortexer intensiv gerührt. Dabei schlugen die Glaskügelchen den trockenen Lipidfilm von der Innenseite des Rundkolbens ab und durch das vorhandene Wasser entstanden durch Hydratation spontan multilamellare Liposomen unterschiedlicher Größe. Die Liposomen wurden über Nacht auf einen Schüttler gestellt.

Am folgenden Tag erfolgte die siebenmalige Extrusion der Liposomen durch eine Polycarbonatmembran der Größe 0.1 μm (Isopore Filtermembran) mit Hilfe von Stickstoff bei 30 bar. Hierfür kam das Modell Basic Extruder der Fa. Lipex zum Einsatz. Nach vier Extrusionsschritten wurde die Polycarbonatmembran ausgetauscht. Die finale Extrusion wurde in einem 15 mL Falcon aufgefangen und bis zur Messung bei 4°C aufbewahrt. Die daraus resultierenden unilamellaren Vesikel hatten eine durchschnittliche Teilchengröße von 100 nm.

3.2.5. Liposomencharakterisierung

Die Teilchengröße der extrudierten Liposomen wurde mittels dynamischer Lichtstreuung in einem Malvern Instruments Autosizer 2C vermessen. Das Gerät wurde auf 25°C temperiert und eine Probe der Liposomen von ca. 100 μL wurde in eine mit Milliporewasser gefüllte Polystyrolküvette gegeben. Die Probe sollte weder stark konzentriert, noch zu sehr verdünnt sein und musste im kolloidalen Größenbereich liegen. Nach dem Messprinzip sollte die Brown'sche Molekularbewegung die einzige Teilchenbewegungsart darstellen. Der monochromatische He-Ne-Laser wurde auf große Partikel eingestellt und die Vermessung der Liposomen wurde gestartet. Das Streulicht aus insgesamt 30 Messungen wurde im 90° Winkel registriert und im Autokorrelator ausgewertet. Hieraus wurden die Parameter Zave als Lage der Partikelgröße und der Polydispersitätsindex als Maß für die Verteilung der Vesikelgröße herausgerechnet.

3.2.6. Messung mit dem QCM LiquiLab 21

Für die Messungen wurde das Modell LiquiLab 21 der Firma ifak Barleben verwendet, welches in Abb. 36 dargestellt ist.

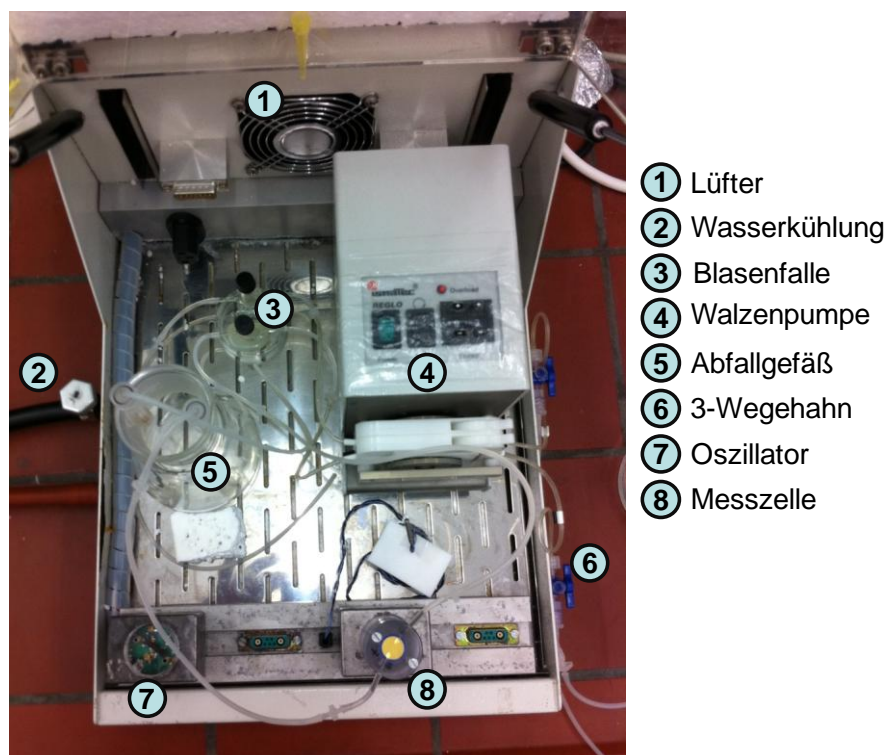


Abbildung 36: QCM LiquiLab21 und seine Bauteile.

Eine externe Wasserkühlung und ein Ventilator im Inneren des Gerätes sorgten für die Temperierung der QCM. Entgastes Milliporewasser wurde mittels einer Walzenpumpe mit einer Geschwindigkeit von ca. 4 $\mu\text{L/s}$ durch das Schlauchsystem befördert. Die Messzellen wurden bei ausgeschalteter QCM auf die Oszillatoren aufgesteckt und als Durchflusssystem geschaltet. Beim Einschalten der QCM wurde eine Wechselspannung über die Oszillatoren an die Messzellen gelegt, die zu einer Quarzschwingung von ca. 10 MHz führten. Die Quarze benötigten etwa 30 min zum Einschwingen. Die Aufzeichnung der Messung erfolgte mit der Software LiquiLab2000 am angeschlossenen Computer. Nach weiteren 30 min wurden dem System über den 3-Wegehahn 3 mL einer 1 μM Stammlösung der entsprechenden Peptide zugeführt. Dabei sollte eine Blasenfalle die Bildung störender Luftblasen in der Messkammer verhindern und Druckunterschiede ausgleichen. Das Messprogramm registrierte die Frequenz- und Dämpfungsänderungen in Echtzeit.

Bei Kinetikmessungen wurden aus den Frequenz-Zeitverläufen mit Hilfe einer nicht-linearen Regressionsrechnung Assoziations- und Dissoziationskonstanten ermittelt.

3.2.7. Messung mit der E-QCM CHI-430

Der in den Boden der Messzelle eingebaute CV-Quarz diente als Arbeitselektrode und wurde mit dem CHI-430 Hauptgerät verbunden. Als redoxaktive Substanz wurden 3 mL einer 5 mM Kaliumhexacyanoferrat-(III)-Lösung hinzugegeben. Diese Lösung wurde in 50 mL einer 0.1 M Natriumsulfat-Decahydratlösung gelöst. Der Zusatz des Leitsalzes Natriumsulfat erfolgte zur Verhinderung einer Migration der Eisenionen. Die Silber/Silberchlorid-Elektrode, die in einer 3 M Lösung von Kaliumchlorid eingetaucht war, fungierte als Referenzelektrode. Als Hilfselektrode wurde ein Platindraht verwendet. Nach kurzem Abwaschen mit Milliporewasser wurden die Referenz- und Hilfselektroden in die Messzelle eingesetzt und an den CHI-430 angeschlossen. Es wurde eine dreieckförmige Steuerspannung im Bereich von -0.05 V bis +0.6 V mit einer Spannungsgeschwindigkeit von 10 mV/s bei 35 vollständigen Redoxzyklen festgelegt und die Messung gestartet. Die Substanzzugabe erfolgte nach ca. 15 Zyklen. Dabei wurden 15 μ L einer 300.3 μ M Peptidlösung direkt in die Öffnung des Messzellendeckels injiziert.

Aus den Spitzenströmen I_{pa} und I_{pc} des beschichteten CV-Quarzes konnte wegen der Isolierung der Elektrode durch die aufgelagerten Lipidschichten keine Aussage über eine Veränderung der Stromstärke gewonnen werden. Ausgewertet wurden daher Strom-Zeit-Kurven über das Integral zweier aufeinander folgender Läufe, die einen Zyklus bilden.

3.2.8. Messung mit dem SAW S-Sens K5

Das S-Sens K5 der Firma SAW Instruments ist ein akustischer Oberflächenwellen Biosensor. Die Mikroflusszelle der Messkammer wird mittels einer regulierbaren Kolbenpumpe durchströmt. Komplettiert wird das Messsystem durch einen handelsüblichen HPLC-Autosampler mit Sechswegenventil, der für Probenzugabe zuständig ist. In Abb. 37 ist das Messsystem dargestellt:

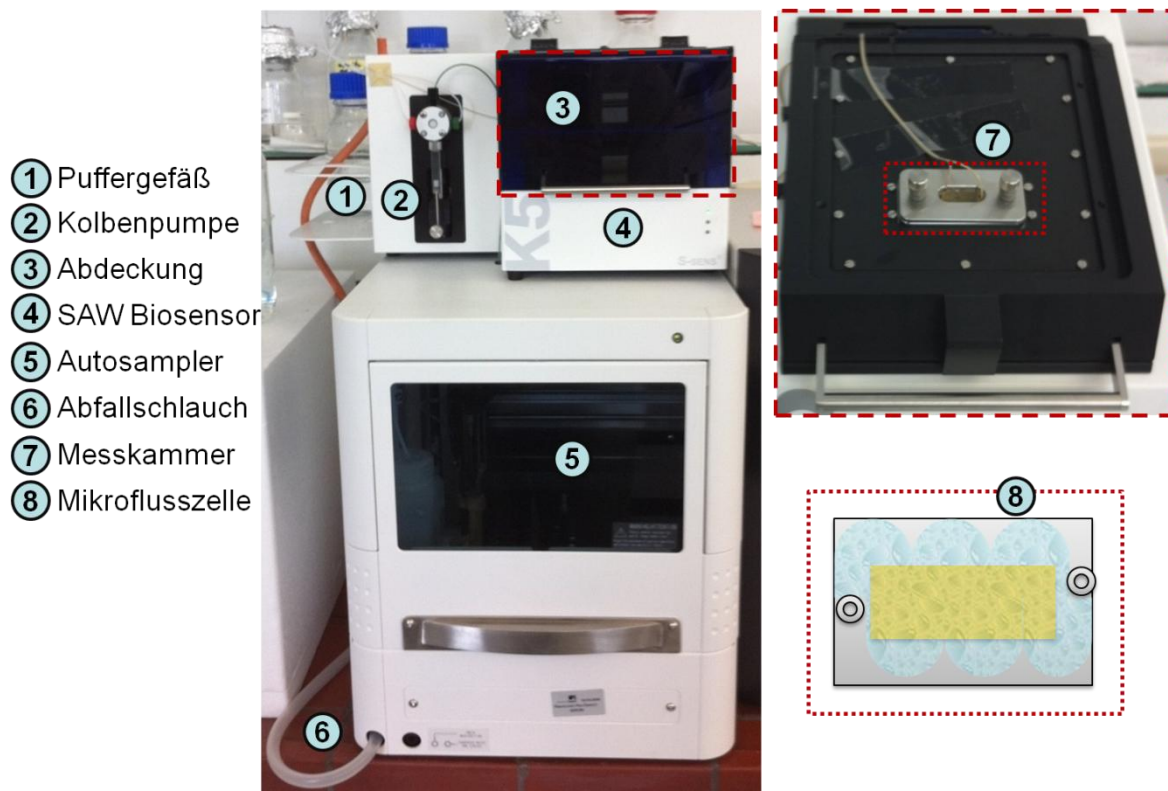


Abbildung 37: SAW Biosensorsystem mit Autosampler, Messkammer und Mikroflusszelle im Detail.

Die Mikroflusszelle wurde mit Milliporewasser gereinigt und mit feinen, fusselfreien Papiertüchern getrocknet. Der beschichtete SAW-Quarz wurde in die Messkammer eingebaut. Der Fluss der Messkammer betrug $15 \mu\text{L}/\text{min}$, um eine luftblasenfreie Befüllung der Kammer zu gewährleisten. Die Flussrate wurde dann auf $40 \mu\text{L}/\text{min}$ eingestellt und nach 10 Minuten wurde im Bereich von 142 bis 155 MHz ein Schwingungsspektrum des eingebauten Quarzes aufgenommen. Die optimale Schwingfrequenz des Quarzes wurde dann ermittelt und als Messfrequenz im Zwei-Frequenzmodus bestimmt. Für weitere 10 Minuten erfolgte eine Phase des Einschwingens. Mit Hilfe der Software SequenceMaster6 wurde die Injektionssequenz programmiert und im Hauptprogramm BiosensK12 geladen. Es wurden $100 \mu\text{L}$ einer 0.1 mM Liposomenlösung mit Hilfe des Autosamplers in das System eingebracht. Nach der Anlagerung der Liposomen an den Quarz wurden jeweils $150 \mu\text{L}$ einer Konzentrationsreihe von 10^{-13} M bis 10^{-6} M der Peptide injiziert. Bei der Messung der Calciumabhängigkeit der Peptidbindungen wurde nach der Liposomeninjektion auf Calciumchlorid umgepuffert und die Konzentrationsreihe des entsprechenden Peptids wurde am Vortag in Calciumchlorid hergestellt. Die Phasen-

verschiebung und die Amplitude wurden während der gesamten Messung in Echtzeit registriert.

3.2.9. Messung mit dem VP-ITC

Das VP-ITC der Firma Microcal ist ein isothermales Titrationskalorimeter, das aus zwei identischen münzförmigen Zellen besteht, die in einem zylindrischen, adiabatischen Mantel eingebettet sind und somit thermisch isoliert sind. Die Zellen bestehen aus einer Speziallegierung namens Hasteloy Alloy C-276, die sich durch eine hohe Beständigkeit gegenüber aggressiven Medien auszeichnet und Lipiden sowie Peptiden gegenüber inert ist. Die Zellen haben über schmale Röhren einen Zugang zur Befüllung. In die Messzelle taucht eine Hochpräzisionspipette ein, die ein Gesamtvolumen von 250 μL aufnehmen kann und Injektionen von exakt 0.1 μL ausführen kann. Zusätzlich ist diese sog. ITC-Spritze mit einem Drehmotor und einem Röhrchenpaddel ausgestattet, um die injizierte Substanz gut mit dem Inhalt der Messzelle zu verrühren und die Entstehung von Konzentrationsgradienten zu verhindern. Abb. 38. zeigt das VP-ITC Messgerät, die ITC-Messzellen und den Thermovac.

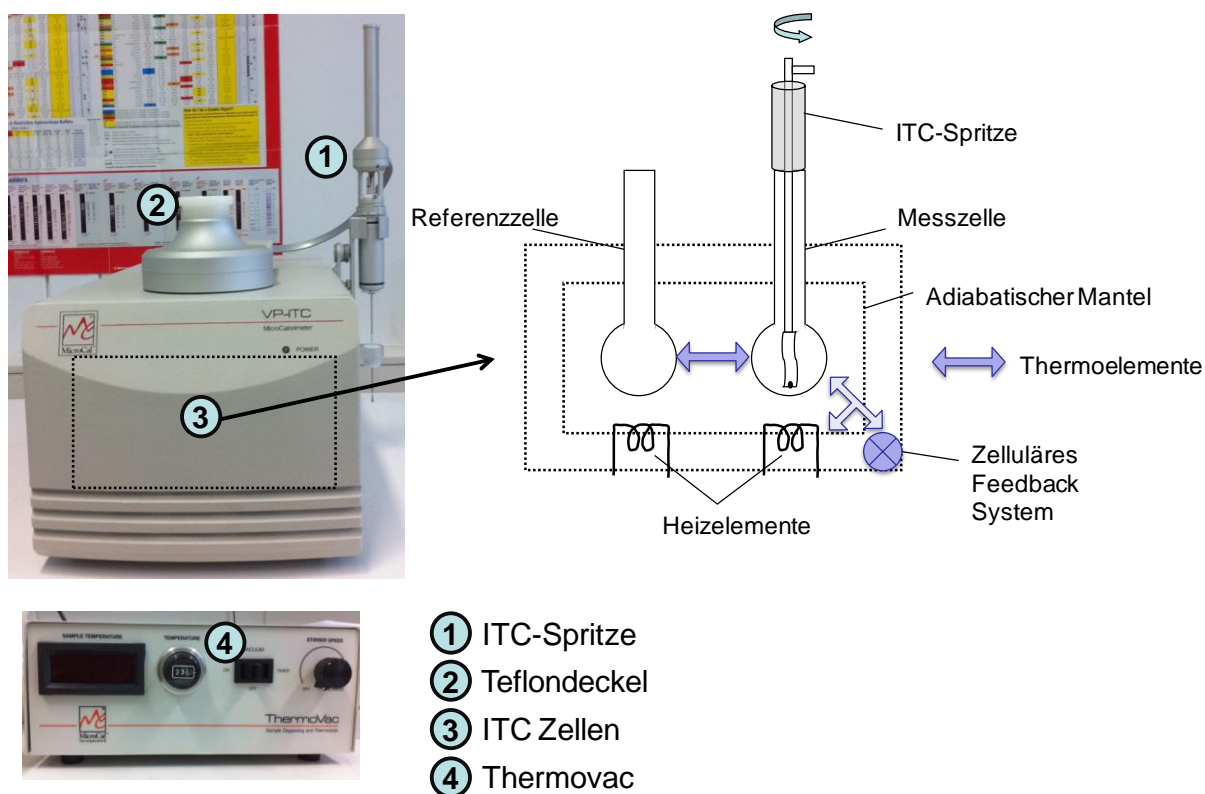


Abbildung 38: VP-ITC (links), Aufbau im Detail (rechts) und Thermovac (unten).

Vor Beginn des Versuchs wurde die Messzelle mehrfach mit Milliporewasser gereinigt. Die Peptide, die Referenz, sowie die Liposomen wurden für acht Minuten im Thermovac bei 23°C temperiert und entgast.

In die Referenzzelle wurden 1.43 mL Millipore Wasser und in die Messzelle 1.43 mL einer 100 μ M Peptidlösung vorgelegt. Die Referenzzelle wurde daraufhin mit einem kleinen Teflondeckel verschlossen. 250 μ L der Liposomenlösung wurden als Titrator in die ITC-Spritze geladen. Anschließend wurde die ITC-Spritze in die Messzelle eingeführt. Vor dem Beginn der eigentlichen Messung wurde eine Vorkalibrierung durchgeführt, indem der Messzelle definierte Spannungsimpulse zugeführt wurden und die Heizleistung mit der Referenzzelle angeglichen wurde. Darauf wurde der Drehmotor der ITC-Spritze aktiviert und eine Basislinie ermittelt. Hatte die Basislinie eine ausreichende Konstanz, so wurde die Messung am VP-ITC im high-gain Modus, der eine schnelle Rekalibrierung zwischen den einzelnen Injektionen gestattet, gestartet und die Titrationsverläufe mit dem Programm VPViewer verfolgt. Gemessen wurde bei 25°C, die Referenzheizleistung betrug 8 μ cal/s und es wurden 50 Injektionen à 5 μ L der Liposomen in die Messzelle ausgeführt. Als Messwert wurde die Änderung der Messzellenheizleistung als Funktion der Zeit aufgezeichnet. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Zusatzsoftware Microcal Origin.

3.2.10. Messung am Fluoreszenzspektrometer

Das Fluoreszenzspektrometer LS 55 von Perkin Elmer wurde zur Vermessung der Liposomenfluidität eingesetzt. Als fluoreszenzempfindlicher Farbstoff wurde eine Merocyanin MC540-Lösung in PBS verwendet (20 μ g/mL). Dazu wurden Liposomen in PBS-Puffer hergestellt und MC540 in einem molaren Anteil von 1:1000 Farbstoff zu Lipid hinzugefügt. Nach einer Wartezeit von 20 min bei 8°C wurde ein Emissionsspektrum bei fester Anregungswellenlänge ($\lambda = 540$ nm) aufgenommen und der Emissionswert bei $\lambda = 584$ nm notiert. Die Peptidzugabe erfolgte bei einem Peptid zu Lipid-Verhältnis von 1:10 bzw. 1:1. Die anschließende Vermessung der Proben fand erneut bei den angegebenen Wellenlängen statt.

3.2.11. Durchgeführte Messungen

Im Rahmen dieser Dissertation wurden folgende Messungen am Pharmazeutischen Institut in Bonn durchgeführt:

Tabelle 13: Durchgeführte Messungen in dieser Dissertation. 1=DOPC, 2=Lipid II, 3=C55P, 4=Ca.

Peptide	QCM	ITC	SAW	CV	Fluoreszenz
Gallidermin	✓ 1,2	✓ 1,2,3	✓ 1,2		✓ 1
Nisin		✓ 1,2			
Vancomycin	✓ 1,2	✓ 1,2,3	✓ 1,2	✓ 1,2	✓ 1
Telavancin	✓ 1,2	✓ 1,2		✓ 1,2	
Friulimicin		✓ 1,3,4			
Daptomycin	✓ 1,2, 4	✓ 1,2,4	✓ 1,2,4		

Ein Teil der ITC-Messungen des Telavancins und Friulimicins fand in Kooperation mit dem Biozentrum in Basel statt.

Insgesamt wurden die Messungen mindestens fünfmal wiederholt. Angegeben werden Mittelwert, sowie Standardabweichung. Im Ergebnisteil werden ausgewählte Abbildungen präsentiert.

Für die Berechnung der statistischen Signifikanz (Konfidenzintervall: 95%) mit dem ungepaarten t-Test wird folgende Klassifikation vorgenommen:

Tabelle 14: Statistische Signifikanz.

Abkürzung	Signifikanz	Bewertung
n.s.	$p > 0.05$	nicht signifikant
*	$p \leq 0.05$	signifikant
**	$p \leq 0.01$	hoch signifikant
***	$p \leq 0.001$	höchst signifikant

4. Ergebnisse und Diskussion

Durch den kombinierten Einsatz der Biosensortechniken QCM, SAW und CV sowie der ITC wurde die Wechselwirkung antimikrobieller Peptide an Modellmembranen gemessen. Dabei wurden neben kationischen Peptiden wie Gallidermin, Vancomycin und Telavancin auch anionische Vertreter wie Friulimicin und Daptomycin untersucht. Im Fall der QCM und der CV dienten immobilisierte Phospholipide aus DOPC auf Quarzoberflächen als Modell einer bakteriellen Membran. Bei der ITC und der SAW wurden unilamellare DOPC-Vesikel als Modellmembranen verwendet.

Die QCM erlaubt die Berechnung von Bindungskonstanten (K_D) durch die Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationskinetiken (k_{Ass} und k_{Diss}). Die ITC liefert Parameter wie Enthalpie (ΔH), Entropie (ΔS) und kann ebenfalls Bindungskonstanten (K_D) ermitteln. Mittels der CV können Membranpermeabilisierungen erfasst werden. Die folgende Tabelle fasst die Messprinzipien und die Auswertemöglichkeiten der Biosensoren zusammen:

Tabelle 15: Übersicht der Biosensoren mit Messprinzipien sowie Auswertung.

	QCM	SAW	ITC	CV
Messung	Frequenz	Phase	Heizleistung	Stromstärke
Sensorik	massesensitiv	massesensitiv	kalorimetrisch	elektrochemisch
Parameter	k_{Ass} , k_{Diss} , K_D	k_{Ass} , k_{Diss} , K_D	ΔH , ΔS , K_D	ΔI

Die unterschiedlichen Messmethoden erlauben dabei den Fokus auf verschiedene Aspekte des molekularen Wirkmechanismus der Peptide zu legen. Dabei soll ein Vergleich der Peptide hinsichtlich ihrer Affinität zu Membranen sowie zu einer Zellwandvorstufe als Zielstruktur im Vordergrund der Betrachtung stehen.

Die bakterielle Zellwand dient einer Vielzahl von antimikrobiellen Peptiden als Zielstruktur. Die dabei auftretenden Wirkprinzipien reichen von Bindungen an Zellwandvorstufen (Lipid II oder Baktoprenolphosphat), unspezifischen Membraneinlagerungen, Beeinträchtigungen der Membranordnung bis hin zur Zerstörung der Membran durch Porenbildung.

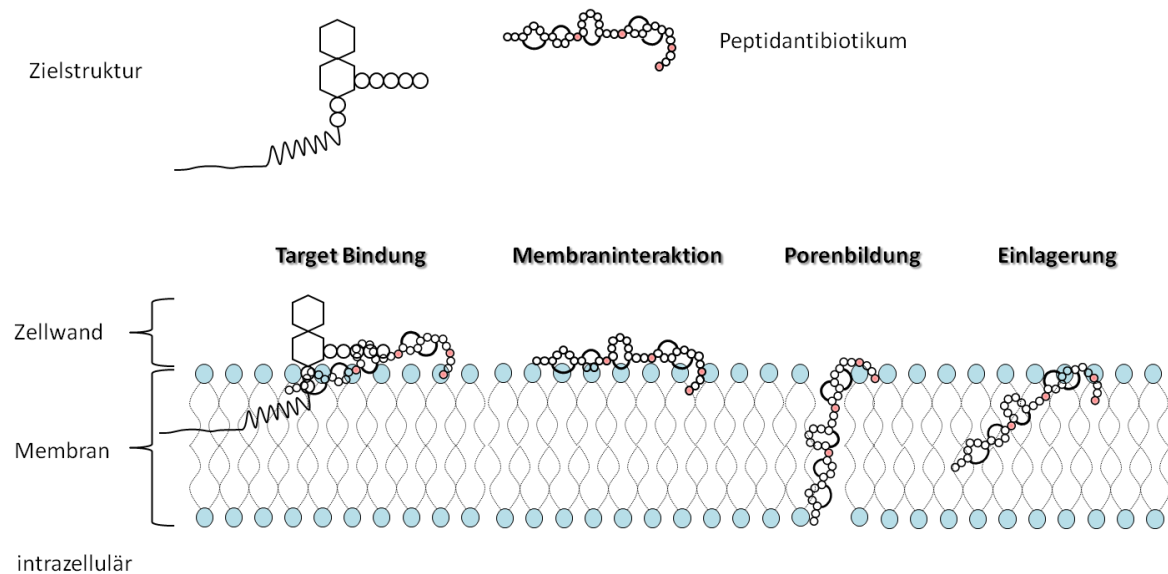


Abbildung 39: Mechanismen der Wechselwirkung von Peptidantibiotika mit bakteriellen Membranen.

Bakterielle Membranen sind hinsichtlich ihres strukturellen Aufbaus und der Komposition der Membranbestandteile hoch komplex. So unterliegt Lipid II keiner zufälligen, statistischen Verteilung wie in Modellmembranen, sondern ist in bestimmten, definierten Bereichen vermehrt anzutreffen, die auch in Analogie zu eukaryontischen Zellmembranen als „lipid rafts“ bezeichnet werden. Sie befinden sich häufig an den Septen der Bakterienmembranen und beinhalten große Teile der Synthesemaschinerie zum Aufbau der Zellwand. Die „lipid raft“ Regionen zeichnen sich außerdem durch einen hohen Gehalt an negativ geladenen Phospholipiden aus. Um einen Ladungseffekt auf die Bindung der Peptide in den Biosensorstudien zu verhindern, wurden negativ geladene Phospholipide bei kationischen Peptiden nicht berücksichtigt.

In diesem Projekt kommen daher Modellmembranen aus 1,2-Dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholin (DOPC) zum Einsatz, um die komplexe Struktur der Bakterienmembran mit diesem neutralen, ungesättigten Phospholipid möglichst einfach und reproduzierbar zu simulieren.

4.1. Gallidermin und Vancomycin

Gallidermin und Vancomycin nutzen beide Lipid II als Zielstruktur zur Durchsetzung ihrer antimikrobiellen Wirksamkeit. Trotzdem weisen beide Peptide Unterschiede in der Wirkung gegenüber bestimmten Bakterienstämmen auf. In Untersuchungen der

Arbeitsgruppe von Prof. Sahl wurde die MIC von Gallidermin und Vancomycin beispielhaft im Vergleich an zwei grampositiven Stämmen ermittelt.

Tabelle 16: MIC Bestimmungen für Gallidermin und Vancomycin.

Peptid	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. cremoris HP	<i>Lactobacillus fermentum</i> ATCC 9338
Gallidermin	0.01 µg/mL	0.0025 µg/mL
Vancomycin	0.31 µg/mL	> 10 µg/mL

Im verwendeten *Lactococcus lactis* Stamm ist Gallidermin bis zu 30fach wirksamer als Vancomycin. Noch dramatischer fällt die Messung im *Lactobacillus fermentum* aus. Hier ist Gallidermin sogar um den Faktor 4000 sensitiver. Diese eindeutigen Abweichungen können nicht nur aus der Targetbindung der Peptide alleine resultieren.

Aufbauend auf bisherigen Untersuchungen wurde die Bindungskinetik des Vancomycins an DOPC-Modellmembranen mit dem QCM-Biosensor vermessen und mit bereits vorhandenen Daten des Gallidermins verglichen [40]. Zusätzlich wurde die bakterielle Zellwandvorstufe Lipid II zu 0.1 mol% in die Lipidmatrix eingebaut, um die Rolle der gemeinsamen Zielstruktur auf die Bindungsintensität der beiden Peptide aufzuklären. Durch die Auswertung der Bindungskonstanten und des Bindungsverlaufs sollen mit Hilfe des direkten Vergleichs zwischen beiden Peptid-antibiotika weitere Aussagen über den molekularen Wirkmechanismus des Gallidermins gewonnen werden.

4.1.1. Messungen der Bindungskinetik mittels QCM

Im Folgenden werden die Ergebnisse der QCM-Messungen von Vancomycin und Gallidermin an DOPC ± Lipid II veranschaulicht.

Tabelle 17: QCM-Bindungskinetik für Gallidermin [40] und Vancomycin an DOPC ± Lipid II Membranen.

Peptid	Membran	Assoziation [L×mol ⁻¹ ×s ⁻¹]	Dissoziation [s ⁻¹]	Bindungskonstante [mol×L ⁻¹]
Gallidermin	DOPC	4135 ± 276	9.87×10 ⁻⁴ ± 4.47×10 ⁻⁴	2.81×10 ⁻⁷ ± 1.55×10 ⁻⁷
Gallidermin	DOPC+Lipid II	1828 ± 876	4.40×10 ⁻⁴ ± 1.32×10 ⁻⁴	2.69×10 ⁻⁷ ± 0.84×10 ⁻⁷
Vancomycin	DOPC	1380 ± 390	2.80×10 ⁻³ ± 0.80×10 ⁻³	2.45×10 ⁻⁶ ± 1.15×10 ⁻⁶
Vancomycin	DOPC+Lipid II	2913 ± 2041	3.60×10 ⁻⁴ ± 2.21×10 ⁻⁴	1.46×10 ⁻⁷ ± 0.41×10 ⁻⁷

Verglichen mit reinen DOPC Membranen ist die Bindung des Vancomycin an Lipid II-haltigen Membranen um den Faktor 15 stärker. Gallidermin zeigt eine vergleichbare Affinität an reinen und Lipid II-haltigen Modellmembranen. Allerdings ist die Gallidermin-Bindung an die reine Membran 10fach stärker ausgeprägt als bei Vancomycin.

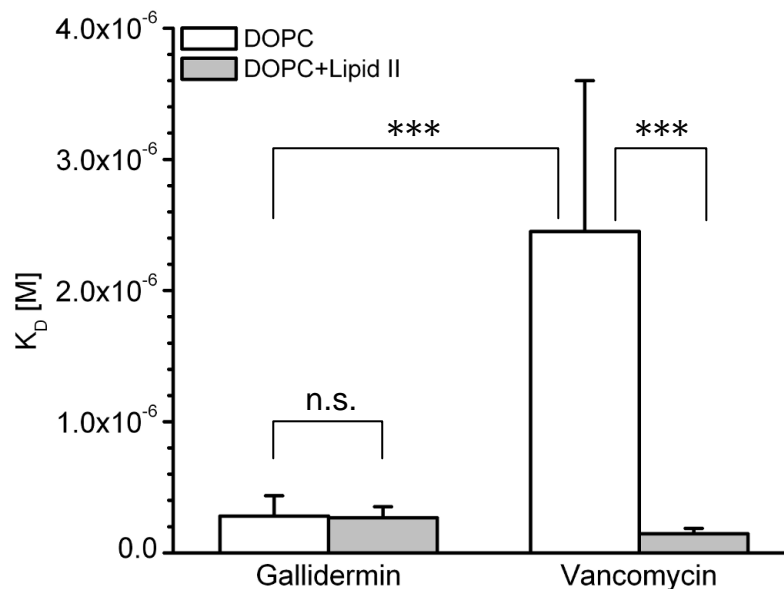


Abbildung 40: QCM-Bindungskonstanten von Gallidermin [40] und Vancomycin an DOPC ± Lipid II Modellmembranen.

Die nahezu identischen Werte der Dissoziation für Gallidermin und Vancomycin von der Lipid II-haltigen Membran können als ein indirekter Beweis für das Targeting des Lipid II von beiden Antibiotika angesehen werden. Tseng et al. ermittelten in ihren QCM-Messungen einen K_D -Wert von 3.20×10^{-6} mol/L für die Vancomycin-Bindung an D-Ala-D-Ala [191]. Dabei wurde eine steigende Vancomycin Konzentrationsreihe von 0.6 μ M bis 40 μ M vermessen und aus den ermittelten maximalen Frequenzabnahmen die Affinität mit einer Scatchard-Plot-Analyse berechnet. Der Unterschied zu den QCM-Messungen dieser Arbeit besteht in der Verwendung eines immobilisierten Pentapeptids auf der Quarzoberfläche, welches isoliert und somit ohne Membrankomponenten betrachtet wurde. Ein großer Nachteil dieser Methode ist der Umstand, dass keine detaillierten Aussagen über die Bindungsprozesse der Assoziation und Dissoziation gewonnen werden können.

In der Gallidermin-Messung ist die sehr hohe Assoziation an reine DOPC-Membranen auffallend, die gegenüber den Lipid II-haltigen Membranen doppelt so hoch ist. Prinzipiell ist eine Tendenz des Gallidermins zur unspezifischen Interaktion mit

Membranen bekannt [40] und kann aufgrund des Anteils an hydrophoben Aminosäuren auch strukturell erklärt werden. Die Assoziationsgeschwindigkeit des Vancomycins dagegen wird durch Lipid II verdoppelt. Damit wird deutlich, dass die Vancomycin-Bindung in erster Linie durch das Lipid II in der Membran beeinflusst wird.

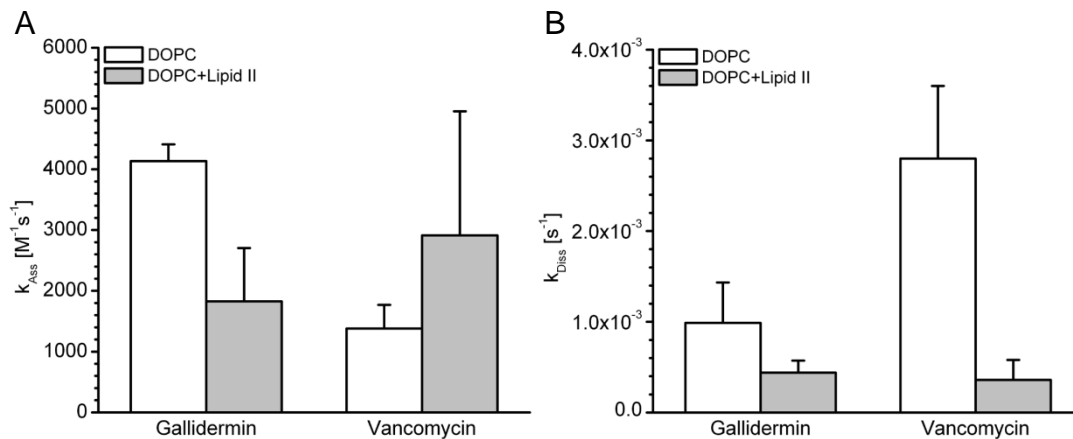


Abbildung 41: Assoziations (A)- und Dissoziationskonstanten (B) von Gallidermin [40] und Vancomycin an DOPC \pm Lipid II-Modellmembranen. Vermessen mit einem QCM-Biosensor.

Vancomycin zeigt eine klare Lipid II-Abhängigkeit der Bindung, während Gallidermin eine sehr hohe Affinität zur reinen Membran besitzt. Die Lipid II-Bindung des Lantibiotikums ist erstaunlicherweise sogar schwächer ausgeprägt. Eigentlich wird für Typ A Lantibiotika eine stärkere Bindung erwartet, wenn die Zielstruktur Lipid II präsent ist. Am Beispiel des Nisins wurde dieser Sachverhalt auch eindrucksvoll mittels QCM bewiesen [21]:

Tabelle 18: QCM-Bindungskinetik für Nisin an DOPC \pm Lipid II Membranen [21].

Peptid	Membran	Assoziation [$\text{L} \times \text{mol}^{-1} \times \text{s}^{-1}$]	Dissoziation [s^{-1}]	Bindungskonstante [$\text{mol} \times \text{L}^{-1}$]
Nisin	DOPC	752 ± 106	$7.70 \times 10^{-4} \pm 4.16 \times 10^{-5}$	$1.03 \times 10^{-6} \pm 1.16 \times 10^{-7}$
Nisin	DOPC+Lipid II	4677 ± 307	$1.77 \times 10^{-3} \pm 2.95 \times 10^{-4}$	$2.68 \times 10^{-7} \pm 1.74 \times 10^{-7}$

Nisin hat eine sechsfach höhere Assoziationsgeschwindigkeit bei der Lipid II Bindung. Die Gesamtaffinität mit $2.68 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$ spiegelt das Verhalten eines Typ A Lantibiotikums mit Lipid II Bindungsmotiv wider.

Damit tritt die Frage auf, weshalb die Lipid II Bindung des Gallidermins sich nicht markant von der DOPC-Messung abhebt. Gallidermin besitzt das gleiche strukturelle Motiv zur Bindung an Lipid II wie Nisin, weist aber einen verkürzten C-Terminus auf. Dieser Bestandteil ist hauptsächlich für die Fähigkeit der Membrandurchdringung mit

anschließender Permeabilisierung verantwortlich [148]. Daher konnte in vorangegangenen Untersuchungen keine Porenbildung des Gallidermins an DOPC-Membranen, auch nicht in Gegenwart von Lipid II detektiert werden [40]. Die Abhängigkeit der Porenbildungsfähigkeit des Gallidermins konnte aber durch die Länge und den Verzweigungsgrad der Phospholipidketten gesteuert werden [40,149]. Die Permeabilitätsmessungen des Vancomycins belegen keine Veränderungen in der Barrierefunktion der Membran. Eine Porenbildung als weiterer Mechanismus der Wirkung des Vancomycins kann damit kategorisch ausgeschlossen werden.

Tabelle 19: CV-Untersuchungen für Gallidermin [40], Vancomycin und Nisin [21] an DOPC ± Lipid II Membranen.

Peptid	Membran	Porenbildung
Gallidermin	DOPC	-
Gallidermin	DOPC+Lipid II	-
Vancomycin	DOPC	-
Vancomycin	DOPC+Lipid II	-
Nisin	DOPC	+
Nisin	DOPC+Lipid II	++

Wie eingangs erwähnt, haben Gallidermin und Vancomycin beide ein Lipid II-Bindungsmotiv, wobei unterschiedliche Bereiche des Lipid II die Zielstruktur bilden. Trotzdem zeigen Gallidermin und Vancomycin stark differierende MICs in bestimmten grampositiven Stämmen. Der primäre Wirkmechanismus der Lipid II-Bindung scheint nach Auswertung der QCM-Biosensordaten nicht für diese Diskrepanz in der Wirkung verantwortlich zu sein. Da auch keine Porenbildung detektierbar war, sind weitere Mechanismen wie die Wechselwirkung mit der Membran, eine verbleibende Möglichkeit, um die Ursache für die verbesserte in vivo Aktivität zu erklären. In der sehr hohen Membranaffinität des Gallidermins könnte der Schlüssel zur Beantwortung dieser Frage liegen.

4.1.2. Messungen der Gallidermin-Bindungskinetik mittels SAW

Um den Mechanismus hinter der hohen Bindungsaffinität des Gallidermins an reinen DOPC-Membran und der möglicherweise überlagerten Lipid II-Bindung zu untersuchen, wurde die SAW-Biosensortechnik eingesetzt.

Im Gegensatz zu den asymmetrischen Doppelschichten der QCM Messungen wurden die Membranen bei der SAW durch aufgespreitete Liposomen auf dem Sensor

erzeugt, die ein realistischeres Modell der Bakterienmembran darstellten. Während man bei der QCM mit einem festen Peptid:Lipid Verhältnis arbeitet, wird in der SAW der Peptidanteil beginnend mit 10^{-13} M schrittweise um eine Zehnerpotenz erhöht. Hierdurch können konzentrationsabhängig Interaktionen registriert werden.

In der folgenden Abbildung ist der Verlauf der Phasenverschiebung und Amplitudenänderung für Gallidermin an DOPC \pm Lipid II dargestellt:

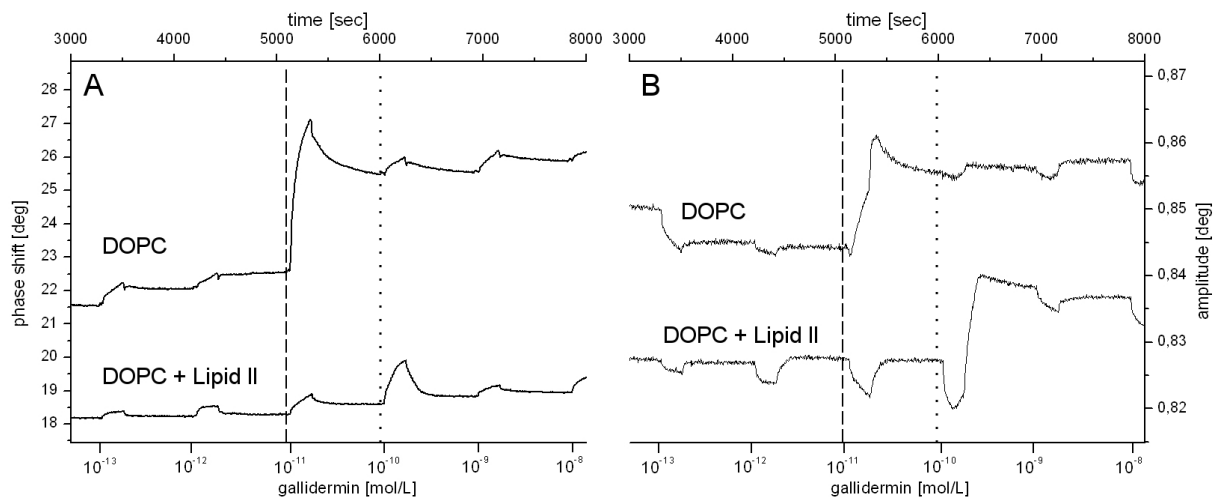


Abbildung 42: SAW-Messung des Gallidermins an DOPC \pm Lipid II Liposomenmembranen. Dargestellt sind die Phasenverschiebungen (A), sowie die Veränderung der Amplitude (B). Die gestrichelte Linie gibt den Bereich der unspezifischen Gallidermin Einlagerung in DOPC wieder, während die gepunktete Linie die Konzentration der Targetbindung an Lipid II beschreibt.

Betrachtet man den Verlauf der SAW-Messung in Abb. 42A, so sticht sofort die sehr starke Phasenverschiebung bei 10^{-11} M (gestrichelte Linie) von $4,45^\circ$ hervor. Aus der zugehörigen Amplitudenänderung wird ersichtlich, dass die sehr starke Interaktion des Gallidermins mit einer Rigidisierung der Membran einhergeht. Damit wird die Annahme einer Einlagerung des Peptids in die Membran unterstützt. Nach diesem charakteristischen Signal scheint die Galliderminbindung gesättigt zu sein und es können keine weiteren bedeutsamen Anstiege in der Phase mehr verzeichnet werden.

Tabelle 20: SAW-Ergebnisse für Gallidermin an DOPC \pm Lipid II Membranen.

	Messung	10^{-13} M	10^{-12} M	10^{-11} M	10^{-10} M	10^{-9} M	10^{-8} M
DOPC	Phase	$0,669^\circ$	$0,423^\circ$	$4,45^\circ$	$0,487^\circ$	$0,602^\circ$	$0,274^\circ$
	Amplitude	$-0,006^\circ$	$-0,002^\circ$	$+0,017^\circ$	$+0,0002^\circ$	$-0,001^\circ$	$-0,003^\circ$
DOPC + L II	Phase	$0,266^\circ$	$0,321^\circ$	$0,739^\circ$	$1,726^\circ$	$0,437^\circ$	$0,665^\circ$
	Amplitude	$-0,002^\circ$	$-0,004^\circ$	$-0,007^\circ$	$-0,01^\circ$	$-0,005^\circ$	$-0,006^\circ$
					$+0,02^\circ$		

In der Messung der Bindung in Gegenwart von Lipid II in der Membran ergibt sich für das Gallidermin eine andere Form von Interaktion. Die Phasenshifts sind in ihren Absolutwerten geringer als in der reinen DOPC-Messung. Bei einer Konzentration von 10^{-12} M und 10^{-11} M sind nur schwache Signale sichtbar, die bei 10^{-10} M (gepunktete Linie) zu einer stärkeren und reversiblen Phasenverschiebung führen. Diese Signale zeigen die Lipid II-Bindung des Gallidermins, die schon bei sehr geringen Konzentrationen auftritt. Gestützt werden diese Ergebnisse durch die Auswertung der Amplitudensignale. Die Bindung des Gallidermins an Lipid II erfolgt in den Konzentrationsbereichen von 10^{-13} M bis 10^{-11} M, die mit einem kleinen Abfall der Amplitude einhergehen und damit einen Anstieg in der Viskoelastizität der Membran repräsentieren. Das trifft auch auf das 10^{-10} M Signal (gepunktete Linie) zu. Nach einem anfänglichen Amplitudenabfall von -0.01° kommt es zu einem plötzlichen Anstieg der Amplitude mit einem Wert von $+0.02^\circ$. Dieser Wert deckt sich außerdem mit der Amplitude der DOPC-Messung ($+0.017^\circ$). Damit wird deutlich, dass die anfängliche Lipid II-Bindung des Gallidermins durch diese Membraninsertion überlagert wird. Weiterhin wird sichtbar, dass durch den stabilisierenden Effekt des Lipid II auf die Membran eine Einlagerung des Gallidermins erst bei höheren Konzentrationen erfolgt als in reinen DOPC-Membranen.

Das Signal bei 10^{-10} M wurde in Hinblick auf das Peptid:Lipid II-Verhältnis näher analysiert. Die Anzahl an Lipid II Molekülen (0.1 mol% in der Lipidmatrix) auf der Sensoroberfläche wurde berechnet, indem man die sensitive Quarzfläche (6 mm^2) durch die durchschnittliche Größe einer polaren Phospholipidkopfgruppe (40 \AA^2) dividiert. So erhält man eine Zahl von 1.4×10^{10} Lipid II-Molekülen in der SAW-Messzelle. Der Peak bei 100 pM beinhaltet insgesamt ca. 1.1×10^{10} Gallidermin Moleküle. Folglich liegt bei dem Signal das Bindungsverhältnis von Gallidermin zu Lipid II von ungefähr 1:1 vor. Interessanterweise liegt dieser Konzentrationsbereich der Galliderminbindung und -membraninteraktion im Bereich der in vivo Aktivität des Lantibiotikums gegen sensitive Keime.

Zusammengefasst geben die SAW-Messungen klare Hinweise für die Lipid II Erkennung durch das Gallidermin. Die dominante Reaktion bei einem 1:1 Bindungsverhältnis belegt klar die Bindung an die Zielstruktur, die mit einer simultanen Membraninsertion einhergeht. In der QCM-Messung überlagerte die starke Membranbindung das Messsignal der Lipid II-Bindung. Die Verringerung der Membraneinlagerung des Gallidermins in Anwesenheit des Lipid II ist vermutlich

verursacht durch stabilisierende Effekte des Lipid II auf die Fluidität der Membran, welche kürzlich auch durch fluoreszenzmikroskopische Experimente (FRAP) nachgewiesen wurden [21].

4.1.3. Messungen der Membranaffinität mittels ITC

Um die Unterschiede in den Membraninteraktionen zwischen Gallidermin und Vancomycin weiter zu charakterisieren, wurde die thermoanalytische ITC als weitere Messmethode verwendet.

Während die Quarzmikrowaage die Gesamtprozesse an der Membran erfasst, liefert die isotherme Titrationskalorimetrie eine thermodynamische Bindungsbeschreibung der Peptid-Membran-Interaktion. Durch die zusätzliche Betrachtung der Enthalpie kann auch eine qualitative Aussage über eine stattfindende Wechselwirkung erfolgen, da diese oft mit einer Wärmeänderung einhergeht. Die ITC-Messungen wurden mit 50 Injektionen der Phospholipid-Vesikel (DOPC \pm Lipid II bzw. DOPC \pm C55P) in die jeweilige Lösung mit festgelegter Peptid-Konzentration ausgeführt.

Aus den ITC-Messungen erhofft man sich weitergehende Einblicke in die Membranaffinität des Gallidermins zu erhalten.

Die folgende Tabelle liefert einen Überblick über die Ergebnisse der ITC-Messungen:

Tabelle 21: ITC-Ergebnisse für Gallidermin und Vancomycin an DOPC \pm Lipid II Membranen.

Peptid	Membran	Enthalpie [cal \times mol ⁻¹]	Entropie [cal \times mol ⁻¹ \times K ⁻¹]	Bindungskonstante [mol \times L ⁻¹]
Gallidermin	DOPC	-5455 \pm 391	6.82 \pm 1.73	3.28 \times 10 ⁻⁶ \pm 0.69 \times 10 ⁻⁶
Vancomycin	DOPC	-508 \pm 165	-	-
Gallidermin	DOPC+Lipid II	-3018 \pm 107	11.49 \pm 1.08	1.89 \times 10 ⁻⁵ \pm 8.37 \times 10 ⁻⁶
Vancomycin	DOPC+Lipid II	-697 \pm 135	-	-
Gallidermin	DOPC+C55P	-4490 \pm 318	8.64 \pm 0.72	7.09 \times 10 ⁻⁶ \pm 3.21 \times 10 ⁻⁶
Vancomycin	DOPC+C55P	-608 \pm 129	-	-

An reinen DOPC-Membranen ergaben sich für das Gallidermin und das Vancomycin folgende ITC-Verläufe:

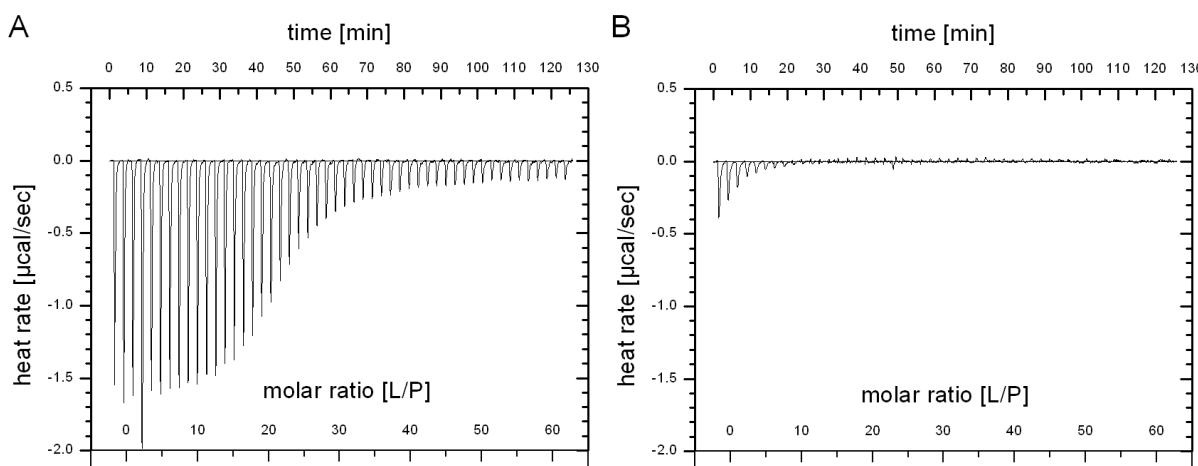


Abbildung 43: ITC-Kurven von Gallidermin (A) und Vancomycin (B) an DOPC-Membranen.

Die ITC-Kurve des Gallidermins zeigt einen typischen, sigmoiden Verlauf von exothermen Peaks und lässt sich in drei Bereiche gliedern. Zunächst findet eine intensive Wechselwirkung mit der Membran statt. Die exotherme Wärme lässt auf eine energetisch favorisierte Reaktion schließen, bei der Wärme freigesetzt wird. Die Heizrate verringert sich kontinuierlich während der Titration von $-1.6 \mu\text{cal/sec}$ und erreicht gegen Ende konstante Werte ($-0.1 \mu\text{cal/sec}$), die für eine Sättigung der Reaktion sprechen. Die Enthalpieänderung liegt bei $-5455 \pm 391 \text{ cal/mol}$. Aus der ITC-Messung des Vancomycins kann man nur eine sehr schwache Wechselwirkung feststellen. Der Enthalpiewert belegt dies mit $-508 \pm 165 \text{ cal/mol}$. Bereits nach fünf Injektionen scheint die Reaktion im Bereich der Verdünnungswärme des Lösungsmittels zu liegen.

Mit einer 10fach höheren Wärmeänderung bestätigt die ITC die starke Interaktion des Gallidermins mit Membranen. Aus dem Verlauf der Gallidermin ITC-Titration kann ferner eine Bindungskonstante ermittelt werden. Der K_D -Wert wird mit $3.28 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ angegeben und ist mit dem K_D -Wert aus der QCM-Messung angesichts der Unterschiede im Versuchsaufbau und der Detektion vergleichbar ($2.81 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$).

Die ITC-Messung des Vancomycins bekräftigt den bisherigen Kenntnisstand, dass Vancomycin keine Tendenz zu einer intensiven Membranwechselwirkung aufzeigt. Aus diesem Grund konnten auch keine Bindungskonstanten ermittelt werden.

Durch den Einbau der Zellwandvorstufe Lipid II in die Vesikel wurde der Einfluss der Zielstruktur auf das Bindungsverhalten des Vancomycins und des Gallidermins untersucht. Hierbei stand die Klärung der Frage im Vordergrund, ob die ITC die

Targetbindung erfassen kann und eine Differenzierung zur Membranbindung möglich erscheint.

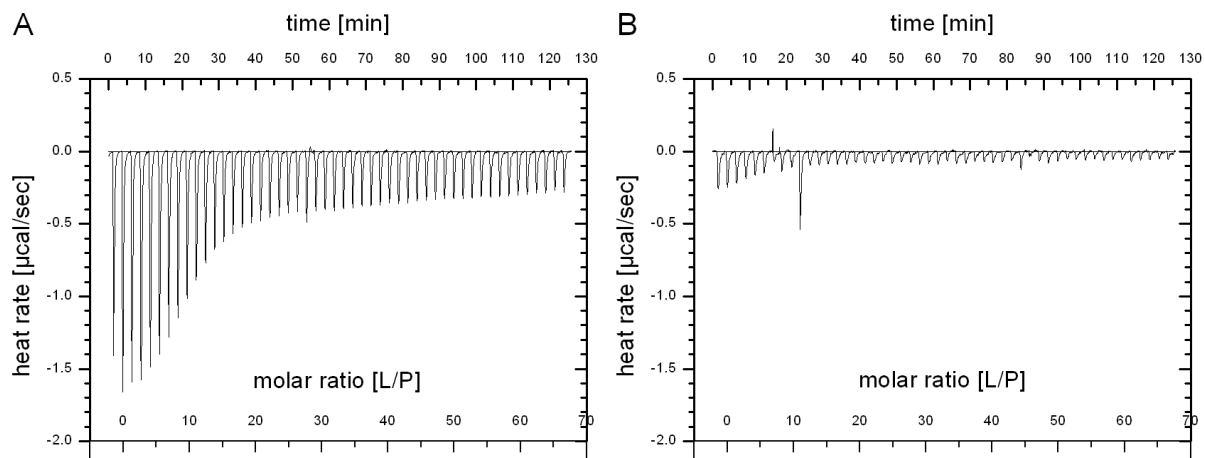


Abbildung 44: ITC-Kurven von Gallidermin (A) und Vancomycin (B) an DOPC+Lipid II-Membranen.

Lipid II führte zu einem veränderten Titrationsverlauf in der Gallidermin-Messung. Der Gallidermin-Verlauf zeigt im Vergleich zur reinen DOPC-Membran ein verändertes Sättigungsmotiv am Ende der Messung ($-0.3 \mu\text{cal/sec}$). Auch tritt die Sättigung der Reaktion bereits früher ein. Die Interaktion des Gallidermins mit den Phospholipiden in der Membran wird erschwert. Der gesunkene Enthalpiewert mit -3018 cal/mol macht dies deutlich. Die thermische Bindungskonstante zeigt eine Abschwächung der Affinität im Vergleich zur DOPC-Membran um den Faktor sechs an. Um zu klären, ob dieses Messergebnis auf eine targetspezifische Bindung zurückzuführen ist, wird die ITC Messung der Vancomycin-Lipid II-Bindung analysiert.

Man erkennt im Kurvenverlauf der Vancomycin-Messung bis auf die leicht erhöhten Blindwerte keine deutlichen Unterschiede zur reinen DOPC-Membran. Wenn die ITC die Lipid II-Bindung erfassen könnte, so hätte sich die Vancomycin-Lipid II-Wechselwirkung (-697 cal/mol) deutlich von der Vancomycin-DOPC-Messung (-508 cal/mol) unterschieden. Man kann somit resümieren, dass die direkte Targetbindung mit der ITC nicht detektierbar ist. Entweder handelt es sich bei der Bindung an die Zielstruktur um einen entropiegetriebenen Prozess ohne Austausch von Wärme, oder die Wärmeänderung ist so minimal, dass sie unter der Erfassungsgrenze der ITC-Messsensorik liegt. Allerdings muss eine erhöhte Affinität zu einer Zielstruktur nicht zwangsläufig zu einem signifikant erhöhten Messwert

führen [226]. In der Literatur existiert eine Studie zur ITC Messung des Lipid II Pentapeptids mit Vancomycin [59]. In dieser Arbeit von Rekharsky et al. wurden Konstanten für die Bindung des Vancomycins an das Pentapeptid und Fragmente des Lipid II ohne Baktoprenolphosphat ermittelt. Obwohl K_D -Werte ermittelt werden konnten (2.08×10^{-6} mol/L), stehen die Ergebnisse aber in keinem Widerspruch zu den ITC-Messwerten dieser Arbeit. Die Menge an Lipid II Äquivalent, die pro Injektion eingesetzt wurde, betrug 2 nmol und ist um den Faktor 13 höher als in dieser Dissertation (0.150 nmol). Außerdem wurden keine Modellmembranen verwendet, weil das Bindungsmodell explizit auf die direkte Interaktion des Pentapeptids mit Vancomycin ausgerichtet war.

Zur weiteren Verifizierung des Ergebnisses der Lipid II-Bindung durch die ITC wurde auch erstmalig die sehr gut beschriebene Nisin-Lipid II-Bindung mit einbezogen.

Tabelle 22: ITC-Messungen für Nisin an DOPC ± Lipid II Membranen.

Peptid	Membran	Enthalpie [cal×mol ⁻¹]	Entropie [cal×mol ⁻¹ ×K ⁻¹]	Bindungskonstante [mol×L ⁻¹]
Nisin	DOPC	-12472 ± 709	-	$1.30 \times 10^{-6} \pm 1.09 \times 10^{-7}$
Nisin	DOPC+Lipid II	-12003 ± 692	-	$1.45 \times 10^{-6} \pm 1.80 \times 10^{-7}$

Hier zeigten sich zwar sehr hohe Enthalpien, die sich aber auch in den reinen DOPC und den DOPC+Lipid II-Messungen nicht signifikant unterschieden ($p = 0.202$).

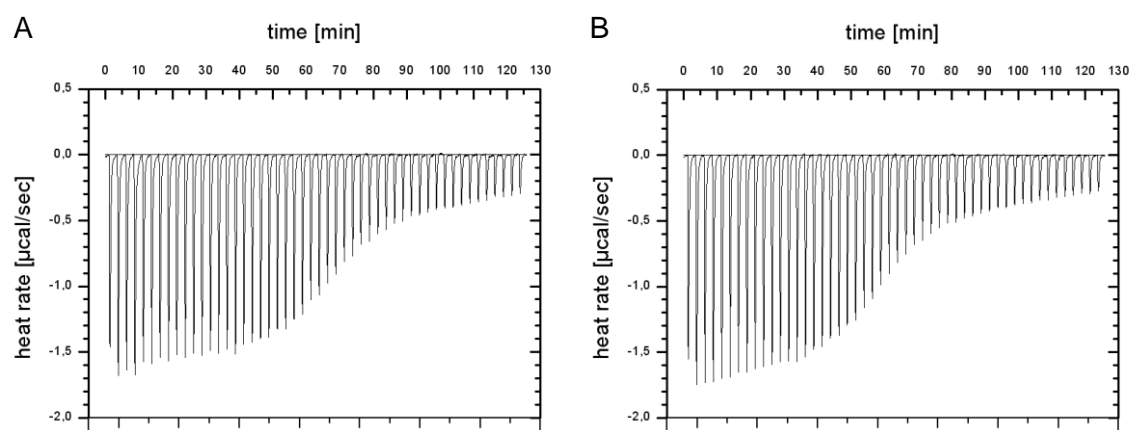


Abbildung 45: ITC-Kurven zur Beschreibung des Bindungsverhaltens von Nisin an DOPC- (A) und DOPC+Lipid II Membranen (B).

Die aufgetragenen kumulierten Wärmen waren nahezu identisch. Auch die Bindungskonstanten legen nahe, dass auch hier kein direkter Effekt der Zielstruktur auf die Bindung des Peptids registriert wurde.

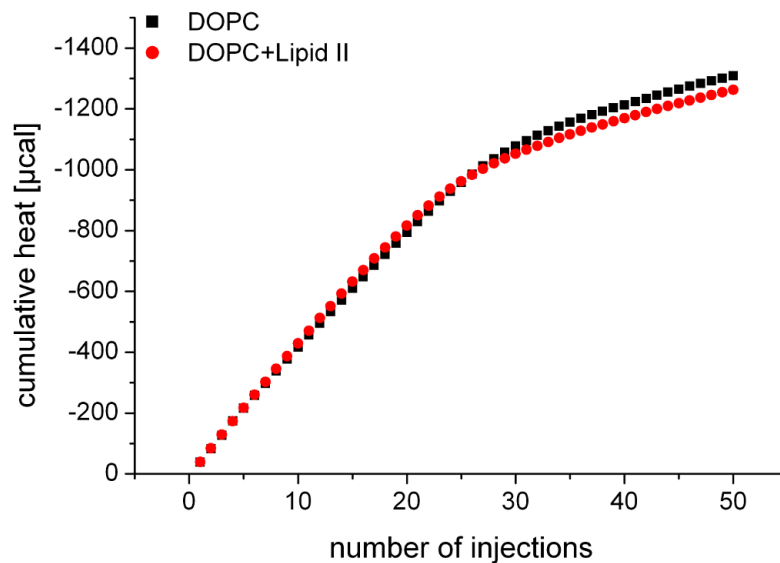


Abbildung 46: Kumulierte Wärmen der ITC-Messungen von Nisin an DOPC-Membranen.

Möglicherweise sind die deutlich erhöhten Wärmeänderungen auf eine verstärkte Wechselwirkung des Nisins mit Phospholipiden aus dem inneren Bereich der unilamellaren Vesikel zurückzuführen, die im Prozess der Porenbildung für das Nisin zugänglich wurden und damit eine erhöhte exotherme Reaktion liefern.

Es wird wiederum sehr deutlich die Grenze der gleichzeitigen Messbarkeit von vorhandener Targetbindung und Membraninteraktion aufgezeigt. Die Lipid II Bindung ist mit diesen Messparametern in der ITC nicht direkt zu erfassen. Membranwechselwirkungen dagegen können gut detektiert und auch untereinander hinsichtlich ihrer Intensität differenziert werden.

Es ist anzunehmen, dass es sich bei der, in ihrer Verlaufsform leicht veränderten, ITC-Messung des Gallidermins in Anwesenheit von Lipid II um stabilisierende Effekte der Zellwandvorstufe auf die Membranordnung handelt. Die Membraneinlagerung wird behindert, da Lipid II die Lateraldiffusion in der Membran verringert und somit auch die Eindringtiefe in die Membran reduziert.

Um festzustellen, welcher strukturelle Teil des Lipid II für die betrachteten Membraneffekte des Gallidermins verantwortlich ist, wurde die Isoprenkette des Lipid II-Moleküls, das sog. Baktoprenolphosphat (C55P) in die Membran eingebaut. Damit fehlen für Gallidermin und Vancomycin die Angriffspunkte an der Zielstruktur.

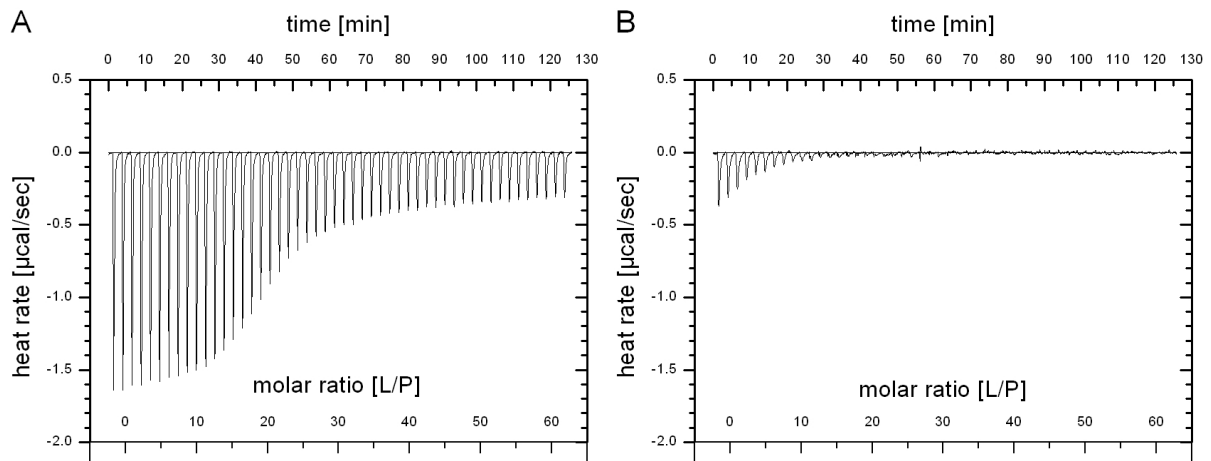


Abbildung 47: ITC-Kurven von Gallidermin (A) und Vancomycin (B) an DOPC+C55P-Membranen.

Der Titrationsverlauf und die Höhe der Peaks im Bereich der Sättigung sind bei Anwesenheit von C55P mit denen des Lipid II-Laufes vergleichbar ($-0.3 \mu\text{cal/sec}$). Das Sättigungsmuster der Gallidermin-Kurve zeigt somit eindeutig den Isopreneffekt, wodurch gefolgert werden kann, dass der beobachtete Lipid II-Effekt größtenteils durch die Isoprenkette verursacht wurde. Somit wird der Lipid II-Einfluss auf die Bindung sekundär über membranäre Effekte in der thermischen Wechselwirkung aufgedeckt.

Für das Vancomycin ist die C55P-Messung eine Bestätigung für die sehr schwache Membraninteraktion (-608 cal/mol). Der C55P-Einbau macht deutlich, dass die ITC in diesem Fall nur membranäre Effekte auf die Peptid-Wechselwirkung aufzeigt.

Die Berechnung des membranär gebundenen Anteils an Gallidermin X_p nach (34) aus den jeweiligen Einzelenthalpien in den genutzten Modellmembranen verdeutlicht die Korrelation zwischen Enthalpie und Membranbindung. In Abb. 48 ist der gebundene Galliderminanteil gegen das molare Verhältnis von Lipid zu Peptid dargestellt:

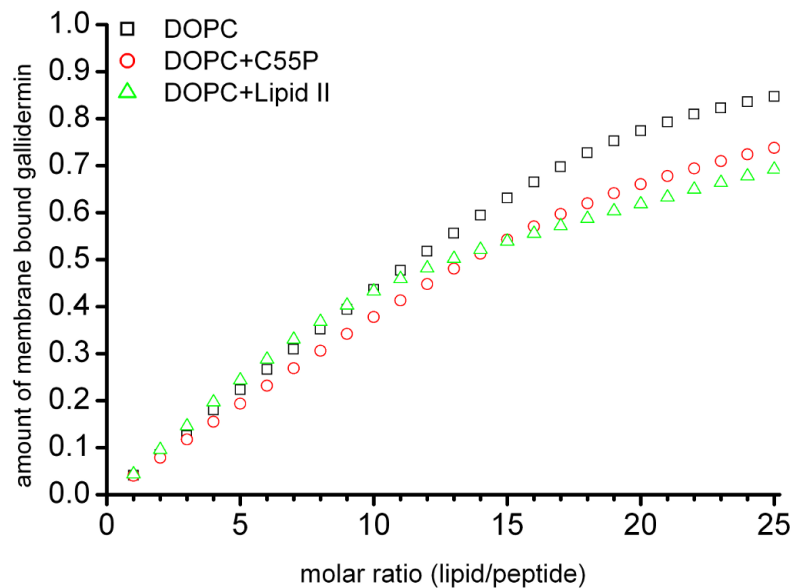


Abbildung 48: Gebundener Anteil des Gallidermins an DOPC-, +C55P, +Lipid II-Membranen.

In der DOPC-Messung ist tendenziell die höchste Menge Gallidermin an der Membran gebunden. Die C55P-Messung weist eine geringere Galliderminmenge in der Membran auf und zeigt mit der Lipid II-Messung eindeutig, dass durch die Isoprenkette die Fähigkeit des Gallidermins mit der Membran zu interagieren, reduziert wird.

Durch Auftragung der kumulierten Wärme gegen die Anzahl der Injektionen werden die Membraneffekte des Gallidermins eindeutig beschrieben.

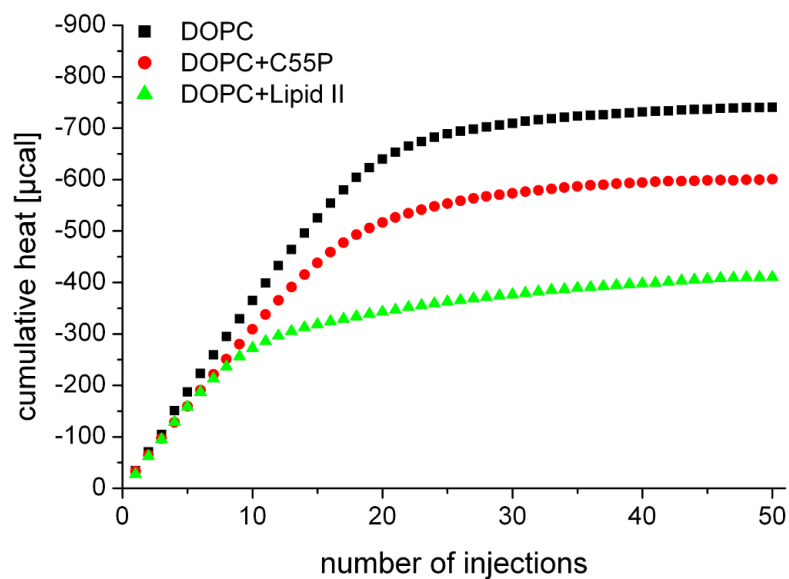


Abbildung 49: Kumulierte Wärmen der ITC-Messungen von Gallidermin an DOPC- (schwarz), +C55P (rot), +Lipid II Membranen (grün).

Bis zur achten Injektion sind die kumulierten Wärmen der Titrationsverläufe identisch, solange die Einlagerung in die Membranen stattfindet. Ab der 10. Injektion kann eine Differenzierung der Kurven hinsichtlich einer Wärmesättigung beobachtet werden. In der Lipid II-Messung ist die Sättigung der Membraninteraktion am schnellsten erreicht (13. Injektion). In der C55P-Messung ist ab der 22. Liposomeninjektion die Enthalpieänderung im Sättigungsbereich, während an reinen DOPC-Membranen die kumulierte Wärme die größten Werte erhält (26. Injektion). Die Membranen mit Zellwandbestandteilen haben insgesamt geringere Wärmewerte, die auf eine reduzierte thermische Interaktion des Gallidermins schließen lassen. Der nochmals verkleinerte Wärmewert für die Lipid II Bindung könnte als ein Indiz für die Bindung des Gallidermins an Lipid II gedeutet werden, womit ein geringerer Anteil für eine Interaktion mit der Membran zur Verfügung steht.

Damit bestätigen die ITC-Messungen des Gallidermins die gemessene Membranaffinität durch die QCM und sind auch im Einklang mit den SAW-Ergebnissen. Die Form der Wechselwirkung kann also mit einer Bindung an die Oberfläche der Membran als auch mit einer Einlagerung in die Membran erklärt werden. Beide Mechanismen würden auch ohne eine Porenbildung auftreten.

4.1.4. Fluoreszenz-Messungen der Membranfluidität

Mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Merocyanin MC 540 kann sensitiv eine Änderung der Membranfluidität, die beispielsweise durch Membraneinlagerung von Strukturen auftritt, durch eine spektrale Änderung der Farbstoff-Fluoreszenz analysiert werden [227,228]. Der Einfluss von Gallidermin und Vancomycin auf die Emission des membranär eingelagerten Farbstoffs Merocyanin MC 540 wurde so durch Verwendung von liposomalen Modellmembranen untersucht. Befindet sich der Farbstoff in einer fluiden Membran, so emittiert er bei 584 nm. Bei Peptiden, die sich in die Membran einlagern, wird der Farbstoff infolge der eintretenden Membranrigidisierung stärker aus der Membran gedrängt und die Fluoreszenz wird entsprechend verringert.

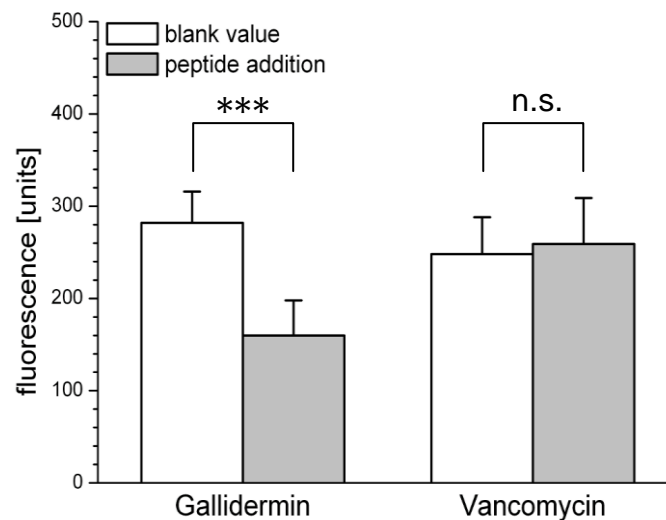


Abbildung 50: Emission des Farbstoffs Merocyanin MC 540 bei DOPC-Liposomen (weiß) und nach Zusatz von Gallidermin bzw. Vancomycin (grau).

Hier zeigt sich deutlich, dass die starke Wechselwirkung des Gallidermins definitiv eine Einlagerung in die Membran darstellt. Das Fluoreszenzsignal wird von 282 auf 160 Einheiten statistisch signifikant abgesenkt ($p = 0.0007$), während Vancomycin keinen signifikanten Einfluss auf die Emission des Farbstoffs hat ($p = 0.711$). Hierbei ist die Emission des MC540 lediglich von 248 auf 259 gestiegen.

Mittels der Fluoreszenzanalysen erhärten sich die Annahmen einer Membraninserterung des Gallidermins als Mechanismus der Membraninteraktion.

4.1.5. Auswertung Gallidermin und Vancomycin

Aufgrund der Daten aus den biosensorischen Untersuchungen werden folgende Modelle über die molekularen Wirkmechanismen der Peptidantibiotika Gallidermin und Vancomycin postuliert:

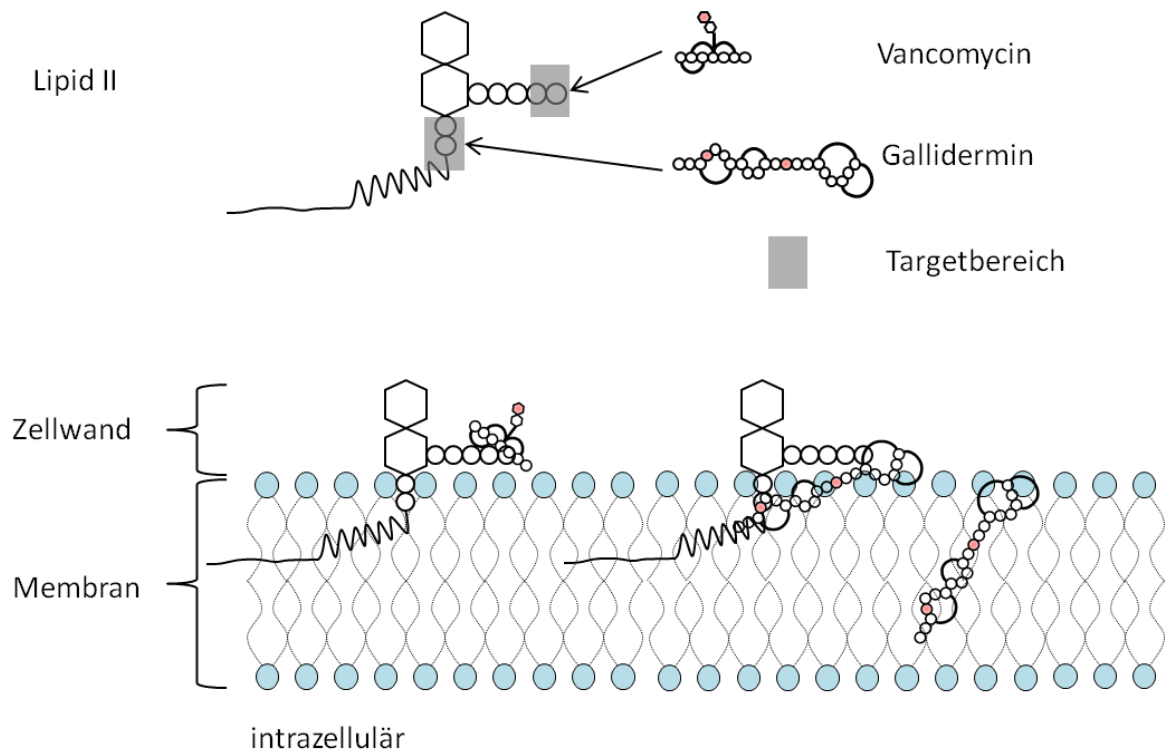


Abbildung 51: Wirkmechanismen von Vancomycin und Gallidermin.

Vancomycin bindet hochaffin die D-Ala-D-Ala Peptideinheit des Lipid II und blockiert somit die Verknüpfung der Zellwandbausteine durch die Transpeptidase. Eine Interaktion mit der Bakterienmembran und eine Membranpermeabilisierung finden nicht statt. Dafür ist das Glykopeptid zu polar und aufgrund der starren Anordnung der zyklischen Heptapeptidkette ist keine Flexibilität zur Anpassung der räumlichen Struktur für eine Einlagerung in die Membran gegeben. So steht zur Ausübung der antibiotischen Aktivität die affine Lipid II-Blockade im Vordergrund.

Gallidermins Angriffspunkt am Lipid II, die Pyrophosphatgruppe, liegt näher an der Membran als bei Vancomycin. Neben der Bindung an Lipid II lagert sich Gallidermin aber zusätzlich in die Bakterienmembran ein, wodurch der primäre Wirkmechanismus überlagert wird. An Lipid II-freien Membranen ist die Tendenz zur Einlagerung noch stärker ausgeprägt und unabhängig von Lipid II. Der unspezifische Mechanismus der Membraninsertion trägt stark zur verbesserten antibiotischen Wirksamkeit bei. Durch eine dreifach positive Ladung ist eine induzierte Anlagerung besonders an eine negativ geladene Membran in „lipid raft“-Bereichen begünstigt. Mittels eines hydrophoben Anteils von 45% werden starke Wechselwirkungen zwischen den lipophilen Arealen des Gallidermins und den Phospholipidketten eintreten. Mit diesem Einfluss auf die Lipidordnung kann somit indirekt auf die laterale Mobilität und Funktionalität des Zellwandpräkursors Lipid II-Einfluss

genommen werden, was zusätzlich zur antibiotischen Wirksamkeit beiträgt. Ein alternatives Modell zur Erklärung der Wirksamkeit von Lantibiotikavertretern wie Gallidermin wurde von Hasper et al. anhand von fluoreszenzmarkierten Lipid II Studien mit Mutacin 1140, das strukturelle Ähnlichkeiten zum Gallidermin besitzt, und Nisin-Derivaten aufgestellt. Darin sequestriert Mutacin 1140 das Lipid II-Molekül in unphysiologische Bereiche und entzieht es somit der Zellwandbiosynthese [150]. Für das Gallidermin wird ein analoges Verhalten angenommen. Eventuell ist dieser alternative Mechanismus forciert durch die Dynamik im Molekül, die eigentlich der Membrandurchspannung dienen soll. Da Gallidermin für eine erfolgreiche Porenbildung zu kurz ist, taucht es in die Membran ein und entfernt das Ankermolekül Lipid II von der aktiven Seite der Zellwandbiosynthese.

Abschließend kann folgendes Modell zur Wirkung des Gallidermins angenommen werden:

Tabelle 23: Wirkmechanismus des Gallidermins.

Schritt	Mechanismus
1	Ladungsinduzierte Annäherung an die Membran
2	Spezifische Bindung an die Pyrophosphatgruppe des Lipid II
3	Verwendung von Lipid II als Anker für eine anschließende Porenbildung in bestimmten Stämmen mit geeigneter Lipidzusammensetzung
4	Starke Membraninteraktion mit Einlagerung in das Membraninnere
5	Blockierung oder Sequestrierung des Lipid II

4.2. Telavancin

Bei Telavancin handelt es sich um ein semi-synthetisches Vancomycin-Derivat. Die strukturellen Unterschiede zwischen Telavancin und Vancomycin beziehen sich in erster Linie auf eine Kohlenstoffkette im Telavancinmolekül, die Telavancin eine gegenüber Vancomycin größere Hydrophobizität verleiht. Das Heptapeptidgrundgerüst mit der Lipid II-Bindungsstelle hingegen ist bei beiden Molekülen identisch. Die Bindung der Glykopeptide richtet sich an das Lipid II-Pentapeptid mit terminaler D-Ala-D-Ala Funktion. Aus MIC Untersuchungen geht deutlich hervor, dass Telavancin auch gegen Vancomycin-resistente Stämme noch aktiv ist [229]. Damit scheidet die Lipid II-Bindung als Grund für die verbesserte Wirkung aus, da die Form der Vancomycin-Resistenz hauptsächlich durch den Austausch von D-Ala gegen D-Lac resultiert.

Interessant in diesem Zusammenhang ist auch die verstärkte Wirksamkeit des Telavancins in Methicillin-sensitiven Stämmen [162]. Da das Bindungsmotiv im Telavancin nicht modifiziert wurde, ist normalerweise nicht mit einer verstärkten Bindung an Lipid II zu rechnen. Die Tatsache, dass Telavancin in diesem Fall wirksamer als Vancomycin ist, kann als Hinweis für zusätzliche involvierte Wirkmechanismen gedeutet werden.

In bisherigen Studien zur Aufklärung des Mechanismus wurde insbesondere die Membrandepolarisation generell als Hauptaspekt für die verbesserte Wirksamkeit herangezogen. Diskutiert wurde über die Rolle der lipophilen Seitenkette, ohne jedoch die Bindung zur Membran im Einzelnen näher zu charakterisieren. Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst QCM-Bindungskinetiken an DOPC ± Lipid II-Modellmembranen angefertigt und in direktem Vergleich zu den Vancomycin Messungen gesetzt.

4.2.1. Messungen der Bindungskinetik mittels QCM

Die Kinetikuntersuchungen des Telavancins mittels QCM haben folgende Messwerte erbracht:

Tabelle 24: QCM-Bindungskinetik für Telavancin an DOPC ± Lipid II Membranen.

Peptid	Membran	Assoziation [L×mol ⁻¹ ×s ⁻¹]	Dissoziation [s ⁻¹]	Bindungskonstante [mol×L ⁻¹]
Telavancin	DOPC	851 ± 225	3.40×10 ⁻⁴ ± 1.60×10 ⁻⁴	4.06×10 ⁻⁷ ± 2.00×10 ⁻⁷
Telavancin	DOPC+Lipid II	1079 ± 295	1.16×10 ⁻³ ± 0.53×10 ⁻³	1.07×10 ⁻⁶ ± 0.34×10 ⁻⁶

Die Affinität zur Bindung des Telavancins an reine DOPC-Membranen ist 2.5 fach höher als an Lipid II-haltigen DOPC-Schichten (p = 0.0003). Anders als im Falle des Vancomycins ist keine stärkere Bindung in Anwesenheit der Zielstruktur zu verzeichnen. Damit zeigt Telavancin als Glykopeptidantibiotikum keine eindeutige Lipid II-Abhängigkeit der Bindung. Yu et al. ermittelten in einem Fluoreszenz Polarisations Assay einen K_D-Wert von 1.81×10⁻⁶ mol/L für Telavancin an einem gelabelten Fragment des Lipid II-Pentapeptids [230]. Die QCM-Messung des Telavancins an DOPC+Lipid II liegt im gleichen Bereich (1.07×10⁻⁶ mol/L). Die Assoziation des Telavancins an die reine Membran ist vermutlich durch die hydrophobe Seitenkette beeinträchtigt. Die molekulare Erkennung des Lipid II durch das Telavancin erhöht die Anlagerungsgeschwindigkeit minimal. Bei der Auswertung der Dissoziation fällt

auf, dass die Ablösung von der reinen DOPC-Membran bei Telavancin achtfach langsamer verläuft als bei Vancomycin. Dies könnte ein Hinweis auf die Verankerung der lipophilen Seitenkette in der Membran sein. Die Dissoziation des Telavancins läuft in Anwesenheit des Lipid II um den Faktor 3.4 schneller ab. Bei Bindung an die Zielstruktur Lipid II scheint die Telavancin-Kette nicht so tief in die Membran verankert zu sein. Die längere Verweildauer des Telavancins in DOPC-Membranen wirkt sich auf die Membranpermeabilität aus, wie CV-Untersuchungen zeigen. Hierbei induziert die Zugabe einer 1.5 μM Telavancin-Lösung einen Stromanstieg in Höhe von ca. 20% in DOPC-Membranen, wodurch die in der Literatur beschriebenen Effekte auf die Membranpermeabilität prinzipiell Bestätigung finden. Higgins et al. arbeiteten mit einer Telavancin Konzentration von 8-10 μM [231], während Lunde et al. ca 18 μM Telavancin in den Assays verwendeten [183]. In Lipid II-Messungen konnten dagegen keine Veränderungen der Membranpermeabilität festgestellt werden. Das Lipid II stabilisiert die Membran und verhindert damit einen effektiven Einfluss des Telavancins auf die Membranordnung in diesem Modell.

In der Literatur wurde eine vermehrte Lokalisierung des Telavancins in bakteriellen Membranen im Bereich des Septums nachgewiesen [184]. Um diese Beobachtung zu verifizieren, wurden die QCM-Modellmembranen dahingehend modifiziert und um negativ geladene Phospholipide erweitert. Das zweifach positiv geladene Telavancin zeigt dabei eine sehr hohe Affinität zur anionischen Membran ($1.49 \times 10^{-7} \text{ mol/L}$).

Die QCM liefert damit gute Ansatzpunkte für die Erklärung der Rolle der Membranwechselwirkung des Telavancins. Ob die Membraninteraktion der Grund für die verbesserte in vivo Wirkung des Telavancins darstellt, sollte mittels ITC aus thermodynamischen Gesichtspunkten weiter verfolgt werden.

4.2.2. Messungen der Membranaffinität mittels ITC

Die folgende Tabelle gibt die thermodynamischen Werte der Telavancin-wechselwirkung mit DOPC \pm Lipid II-Membranen wieder:

Tabelle 25: ITC-Messungen für Telavancin an DOPC \pm Lipid II Membranen.

Peptid	Membran	Enthalpie [cal \times mol $^{-1}$]	Entropie [cal \times mol $^{-1}\times$ K $^{-1}$]	Bindungskonstante [mol \times L $^{-1}$]
Telavancin	DOPC	-3254 \pm 208	9.228 \pm 2.23	3.36 \times 10 $^{-5}$ \pm 0.99 \times 10 $^{-6}$
Telavancin	DOPC+Lipid II	-3036 \pm 192	-	-

Der Unterschied in den Enthalpien der Telavancinbindung an reine oder Lipid II-haltige DOPC-Membranen ist nur von geringfügiger Signifikanz ($p = 0.047$). Wie in den vorangegangenen Lipid II-ITC-Messungen sind die höheren Blindwerte auffallend. Aus den ITC-Verläufen kann man stärker exotherme Peaks als bei den Vancomycin-Messungen erkennen, die auf eine intensivere Lipid-Peptid-Interaktion schließen lassen. Der Verlauf der Titrationskurven ähnelt aber dennoch den Vancomycin-Messungen. Die ermittelte Bindungskonstante aus der DOPC-Messung beträgt $3.36 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ und unterscheidet sich deutlich von den QCM-Werten. Aus der DOPC+Lipid II Messung konnten keine K_D -Werte bestimmt werden.

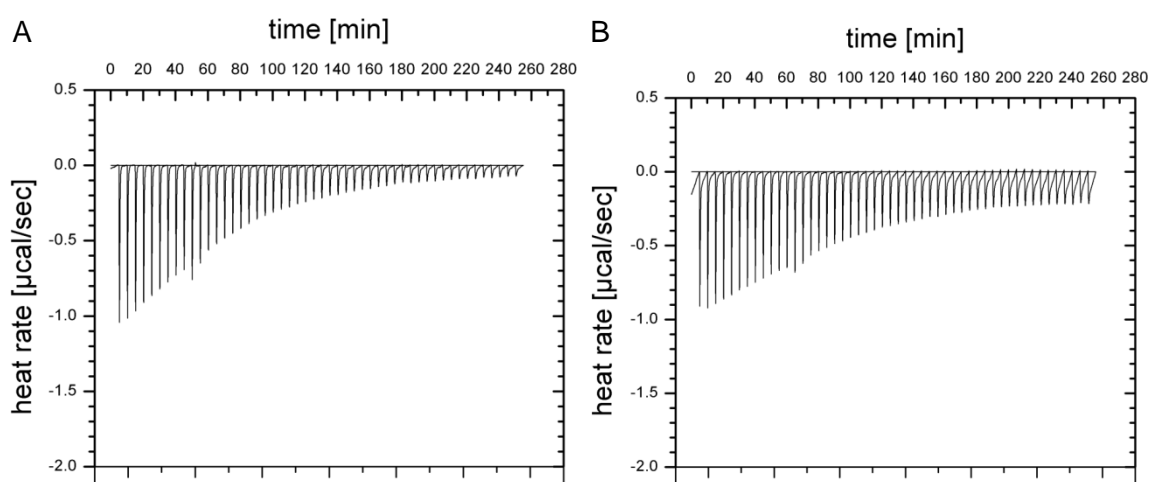


Abbildung 52: ITC-Verläufe für Telavancin an DOPC (A) und DOPC+Lipid II (B) Membranen.

Die Enthalpie der Telavancinbindung an reine DOPC-Membranen ist mit -3254 cal/mol sechsfach höher als bei Vancomycin (-508 cal/mol). Da der strukturelle Unterschied hauptsächlich in der hydrophoben Seitenkette liegt, beweist dies dessen Rolle für die Intensivierung des Membrankontaktes des Telavancins. Allerdings ist die Wärmefreisetzung nicht so deutlich ausgeprägt wie bei Gallidermin (-5455 cal/mol). Auch ist die Kurvenform nicht sigmoid, sondern entspricht eher einer Hyperbel. Damit ist mit einer anderen Form der Membranwechselwirkung des Telavancins zu rechnen. Diese beschränkt sich möglicherweise auf eine intensivierte Oberflächenbindung, ohne dass Telavancin komplett in die Membran eintaucht. Die Präsenz des Lipid II verringert die Enthalpie auf -3036 cal/mol . Dies könnte darauf hinweisen, dass durch die Lipid II Bindung des Telavancins die Kette nicht so tief in die Membran eintaucht. Zusätzlich scheint hier auch die Membranrigidisierung durch Lipid II die Membranwechselwirkungen des Glykopeptids teilweise einzuschränken.

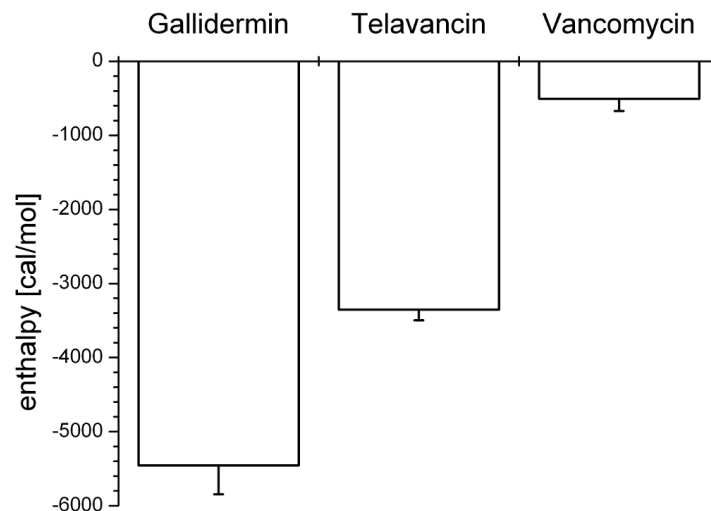


Abbildung 53: Enthalpien von Gallidermin, Telavancin und Vancomycin an DOPC-Membranen.

Eine Beteiligung der Membranwechselwirkung an der Aktivität des Telavancins konnte durch die ITC-Technik eindeutig aufgedeckt werden. Die geringen thermodynamischen Werte deuten allerdings darauf hin, dass der Grad der Membraninserterung nicht die Intensität des Gallidermins erreicht und eine tiefe Einlagerung in die Membran, wie für das Gallidermin gezeigt wurde, unwahrscheinlich erscheint. Dafür ist das Telavancin-Grundgerüst trotz der Alkylkette zu polar, um zwischen die Phospholipidgruppen in das Innere der Membran zu gelangen. Eine partielle Einlagerung der lipophilen Seitenkette dagegen kann durchaus erfolgen und ist gerade in Lipid II-freien Bereichen begünstigt.

4.2.3. Auswertung Telavancin

Bei der Untersuchung des Wirkmechanismus des Telavancins orientiert man sich angesichts der strukturellen Verwandtschaft zum Vancomycin an dessen molekularen Eigenschaften. Telavancin verfügt über das gleiche Heptapeptidgrundgerüst wie Vancomycin. Damit ist eine Bindung an Lipid II und die damit einhergehende Blockade der Zellwandbiosynthese gegeben. Lunde et al. vermuteten, dass die affine Lipid II-Bindung die Positionierung des Telavancins in der Membran vermittelt [183]. Das Lipid II scheint aber nicht in den biophysikalischen Mechanismus der Störung der Membranordnung einbezogen zu sein [232]. Die Interpretation der biosensorischen Daten belegt, dass durch die hydrophobe Aminodecyl-Seitenkette Telavancin auch in Lipid II-freien Membranen in der Lage ist, mit den Phospholipiden in Interaktion zu treten und so die funktionelle Integrität der Membran beeinträchtigt. Vermutlich

wird durch die Insertion der lipophilen Seitenkette in die Membran eine positive Membrankrümmung induziert [183]. Allerdings bildet Telavancin keine definierten Poren, da die strukturellen Voraussetzungen hierfür nicht erfüllt sind.

In Lipid II-haltigen Membranen dominiert die Bindung an die Zielstruktur und die Einlagerung der Kette in die Membran findet aufgrund der starren Gerüsts nicht im gleichen Ausmaß statt, wie in reinen Membranen. Dennoch hat der Membrankontakt unterstützende Auswirkung auf die Aktivität des Glykopeptidantibiotikums.

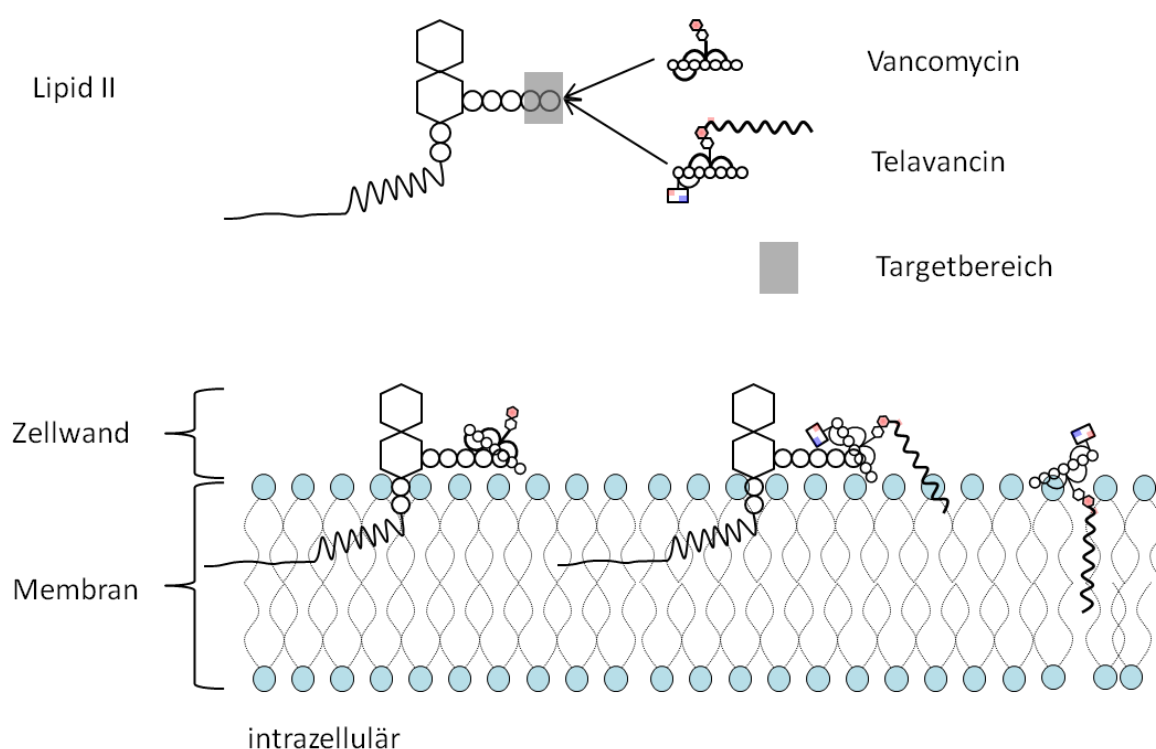


Abbildung 54: Postulierter Wirkmechanismus des Telavancins anhand simulierter Membraninteraktionen.

Eine große Rolle spielt auch die Anwesenheit von Phosphatidylglycerol in den Septen während der Zellteilung, das eine ladungsvermittelte Anziehung auf das protonierte sekundäre Amin an der lipophilen Kette und den benachbarten Aminozucker ausübt und damit das Telavancin verstärkt in dieses Lipid II-reiche Areal führt. Die positiven Ladungen sind im Bereich der Seitenkette lokalisiert und forcieren damit die Insertion.

Eine Abschwächung der Lipid II-Bindung des Telavancins in resistenten Keimen könnte durch eine Verankerung in der Membran abgemildert werden, da der Kontakt zur Zielstruktur weiterhin aufrecht erhalten wäre. Außerdem würden unspezifische

Membraninteraktionen als weiterer Wirkmechanismus den antimikrobiellen Effekt steigern.

Mit den Erkenntnissen der Biosensormessungen kann basierend auf den bisherigen Ergebnissen folgender Mechanismus vorgeschlagen werden:

Tabelle 26: Wirkmechanismus des Telavancins.

Schritt	Mechanismus
1	Targetvermittelte und ladungsassoziierte Annäherung des Telavancins an die Membran
2	Verankerung in der Membran durch die Seitenkette
3	Bindung an Lipid II und damit Blockade der Zellwandbiosynthese
4	Störung der Membranordnung

4.3. Friulimicin

Die bisher beschriebenen Untersuchungen bezogen sich auf die Wechselwirkung kationischer Peptide mit Membranen zwecks Simulierung der antibiotischen Aktivität in grampositiven Bakterien. Allerdings sind auch anionische Peptide gegenüber grampositiven Keimen wirksam. Als Vertreter dieser Gruppe wurden in dieser Dissertation beispielhaft Lipopeptide wie Friulimicin und Daptomycin herangezogen. In mehreren Voruntersuchungen konnte eindrucksvoll gezeigt werden, dass Lipopeptide für die Entfaltung ihrer vollen Wirkung Calcium-Ionen benötigen [193,201]. Für das Friulimicin wurde mit der Zellwandvorstufe C55P sogar eine einzigartige Zielstruktur identifiziert [222]. Die Bindung des Friulimicins wurde mittels QCM bereits untersucht. Dabei konnte ohne den Zusatz von Calcium keine Kinetik bestimmt werden. Das Friulimicin-Calcium-Salz hatte an der C55P-haltigen DOPC-Membran eine sechsfach höhere Affinität als zu der reinen DOPC-Schicht. Bei annähernd gleichen Anlagerungsgeschwindigkeiten war die Dissoziation der entscheidende Parameter, um die Rolle des Calciums für die Wechselwirkung des Friulimicins mit dem C55P zu begründen [223]. Friulimicin scheint die Membranordnung nicht zu beeinträchtigen. Elektrochemische Untersuchungen haben keine Hinweise auf Änderungen des Membranpotentials ergeben [222].

Ungeklärt bleibt aber die Frage, welche Rolle das Calcium für den Wirkmechanismus des Friulimicins trägt und inwieweit dies auf membranäre Effekte zurückzuführen ist. Daher sollen im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch die Notwendigkeit von Calcium für die Membranbindung des Friulimicins erstmals thermodynamisch aufgeklärt werden.

4.3.1. AFM Aufnahmen des Friulimicins an Modellmembranen

In der Arbeitsgruppe von Prof. Udo Bakowsky (Universität Marburg) wurden AFM-Aufnahmen von der Wechselwirkung des Friulimicins mit DOPC-Modellmembranen durchgeführt. Der Einfluss des Calciums und des C55P auf die Bindung des Friulimicins sollte auf diese Weise illustriert werden.

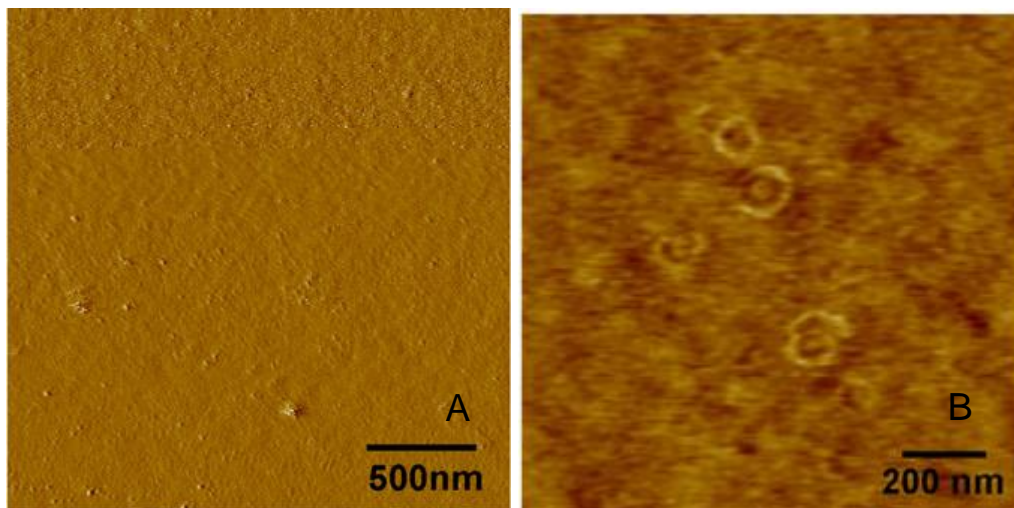


Abbildung 55: AFM Aufnahmen einer DOPC-Membran (A), sowie einer DOPC+C55P-Membran (B).

Die Abbildungen zeigen eine sehr homogen aufgebaute DOPC-Membran. Durch den Einbau von 0.1 mol% C55P sind auf den Aufnahmen Cluster in dem Lipidfilm zu sehen, die auf eine ringförmige Anordnung der C55P-Moleküle in der Membran schließen lassen. Damit ist gewährleistet, dass die Zellwandvorstufe C55P zu Änderungen an der Oberflächenstruktur des DOPC führt.

Nachfolgend wurde Friulimicin zu den Filmen gegeben, um zu überprüfen, ob sichtbare Veränderungen an der Oberflächengestalt eingetreten sind.

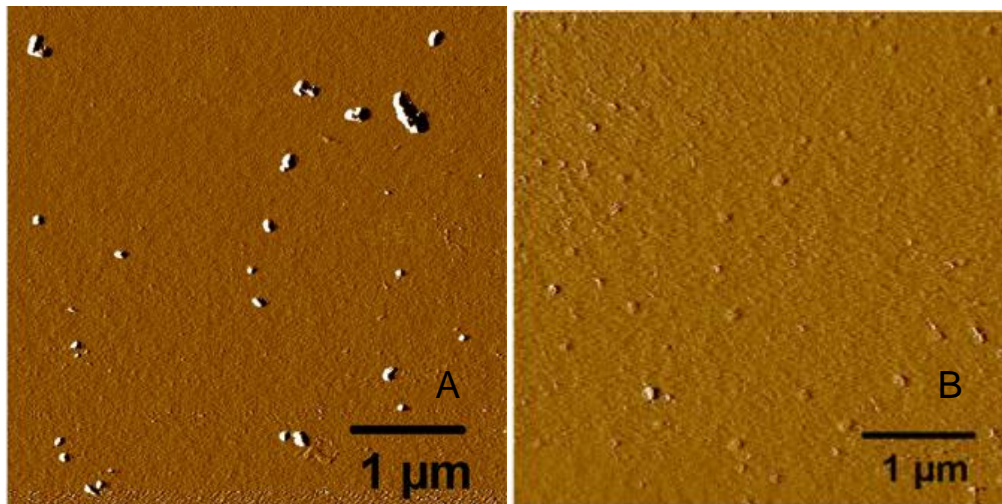


Abbildung 56: Friulimicin-Aggregate auf einer DOPC (A) und DOPC+C55P (B) Schicht.

Die Zugabe von Friulimicin (Abb. 56A) oder dem Friulimicin-Calcium (hier nicht dargestellt) lässt an der DOPC-Membran große Aggregate erkennen. Diese sind offensichtlich nur lose an der Oberfläche assoziiert, mit Unterschieden in ihrer Form und Größe. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Strukturen aus einer Vielzahl von Friulimicin-Molekülen bestehen, die möglicherweise über intermolekulare Anziehungskräfte zwischen der positiv geladenen AS Dab an Position 9 mit den anionischen AS Asp an Positionen 4, 5 und 7 ausgebildet werden. Es steht allerdings fest, dass Calcium-Ionen keinen Einfluss auf die Aggregatbildung haben, da auch identische Aggregate mit Friulimicin-Ca detektierbar waren (nicht gezeigt). Betrachtet man die DOPC-C55P-Membran, so sind nach Addition des Friulimicins die Aggregate noch vorhanden aber deutlich in ihrer Anzahl und Größe reduziert. Die Clusterstruktur aus Abb. 56B ist auch in dieser Aufnahme sehr gut sichtbar. Die Friulimicinmoleküle binden an das C55P und zeigen keine Neigung zur Ausbildung großer Aggregate an der Membran, wenn die Zielstruktur sich in der Membran befindet. Durch das C55P ist eine Interaktion der Friulimicin-Moleküle untereinander herabgesetzt.

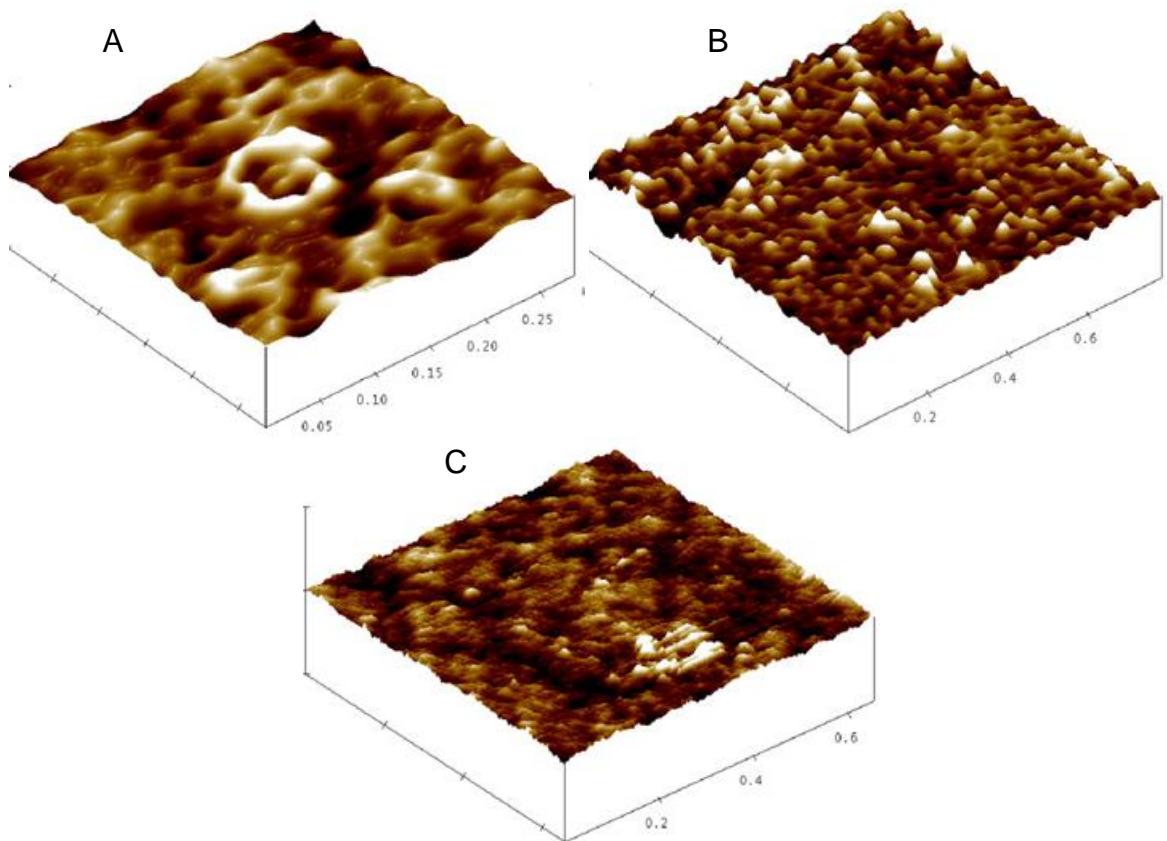


Abbildung 57: Detaillierte AFM Aufnahmen einer DOPC+C55P (A) Schicht. Nach Zugabe von Friulimicin (B) und Friulimicin mit Calcium (C).

Betrachtet man die C55P-Schicht in einer höheren Auflösung (Abb. 57A), so ist die Clusterstruktur deutlich zu erkennen. Nach Bindung des Friulimicins an C55P (Abb. 57B) lassen sich Erhebungen an den Clustern des Films feststellen. Ist gleichzeitig Friulimicin und Calcium an der C55P-Schicht zugegen (Abb. 57C), so wird die gesamte Schicht zunehmend flacher und dichter an der Oberfläche gepackt, was für eine verstärkte und geordnete Friulimicinbindung sprechen würde. Dieser Konstellation hatten die QCM-Messungen die höchste Affinität zugewiesen.

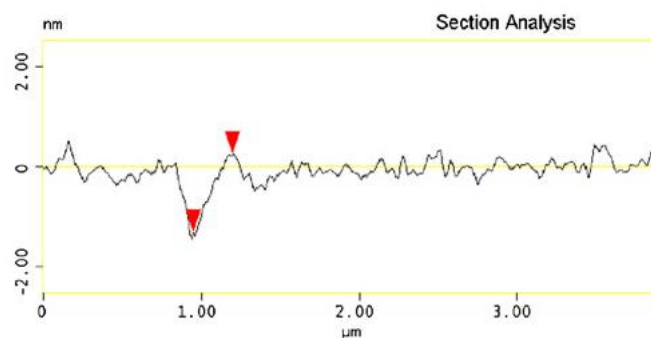


Abbildung 58: Sektionsanalyse der DOPC+C55P-Schicht nach Zugabe von Friu-Ca.

Die Auswertung einer detaillierten Sektionsanalyse (Abb. 58) der Friulimicin-Ca-C55P-Bindung legt den Schluss nahe, dass Höhenunterschiede im Lipidfilm von ca. 1 nm in diesen Schichten vorherrschen und damit die Hypothese einer dicht-angeordneten Friulimicin-Bindung untermauern. Die Membranstruktur bleibt aber insgesamt in allen untersuchten Filmen ohne Zerstörung intakt [222].

4.3.2. Messungen der Membranaffinität mittels ITC

Die kalorimetrischen Experimente zur Untersuchung des Friulimicins sahen mehrere Messansätze vor, die Aufschluss über die Rolle des Calciums und des C55P im Einzelnen und in simultaner Weise bringen sollten. Da auch die AFM-Aufnahmen keine genaue Aussage über die Form der Membranwechselwirkung erbringen konnten, wurden ITC-Messungen für das Friulimicin an DOPC \pm C55P \pm Ca-Modellmembranen durchgeführt, die in Abb. 59 dargestellt sind:

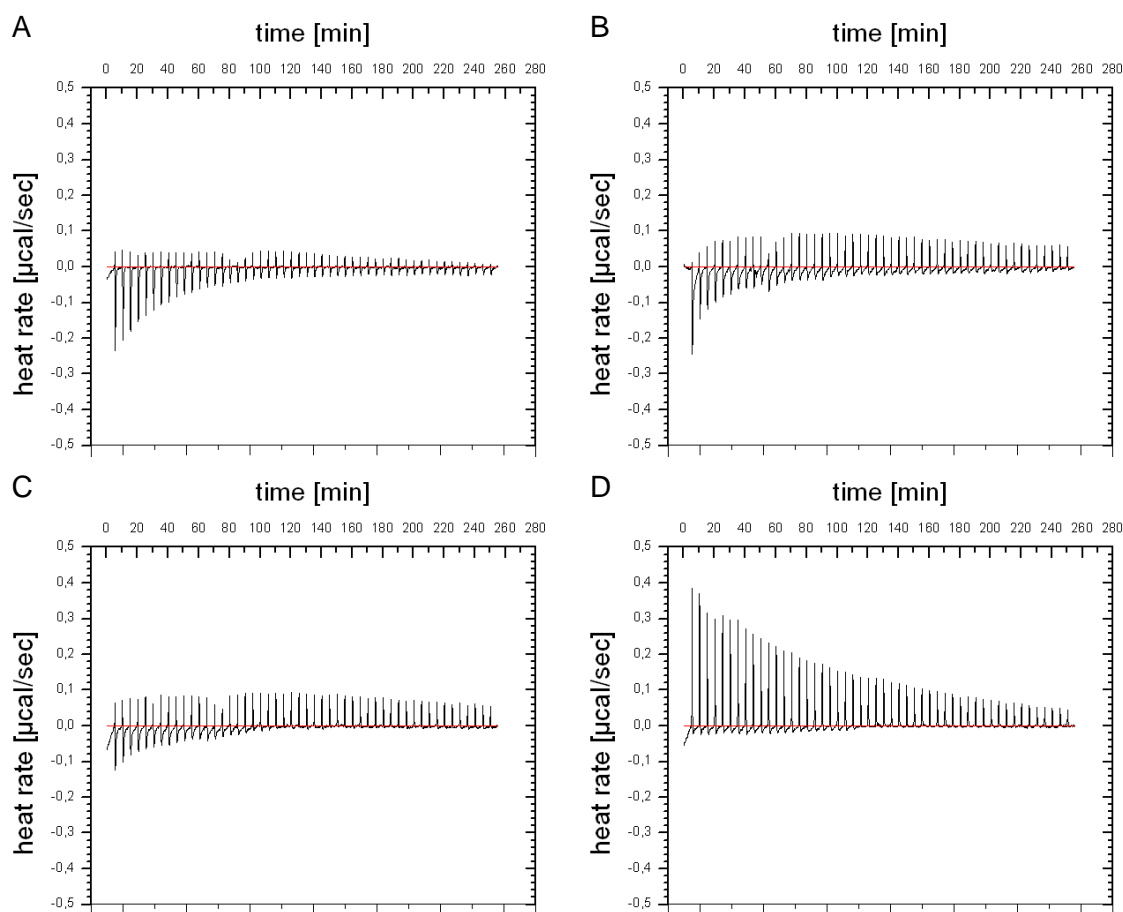


Abbildung 59: ITC-Verläufe für Bindungsexperimente von Friulimicin an (A) DOPC-, (B) DOPC+Ca²⁺-, (C) DOPC+C55P- und (D) DOPC+C55P+Ca-Modellmembranen.

Die ITC-Messungen des Friulimicins mit DOPC-Membranen (Abb. 59A) zeigen sehr geringe exotherme Enthalpieänderungen (-799 cal/mol). Die Kurvenform lässt auf eine sehr schwache Oberflächenwechselwirkung schließen. Friulimicin hat ein polares Grundgerüst mit einer zweifach negativen Nettoladung. Wird die gleiche Messung unter Calcium-Zusatz (Abb. 59B) durchgeführt, so nimmt die Wärmeänderung geringfügig kleinere Werte an (-668 cal/mol). Auf den ersten Blick wird die Bindung also noch schwächer, obwohl die Ladung durch das Calcium ausgeglichen wurde und die Friulimicin-Struktur damit einen amphipathischen Charakter erhält. Allerdings gibt es folgende Besonderheit zu beachten: Die ITC-Kurve verschiebt sich leicht in den endothermen Bereich. Das Calcium führt zu einer Reaktion, die Energie benötigt. Möglich wäre eine calciumvermittelte Dimerenbildung, die als Wirkform in Analogie zum ähnlich aufgebauten Tsushimycin-Dimer angenommen wird [221]. Bei Einbau der Friulimicin-Zielstruktur C55P (Abb. 59C) sinkt die Enthalpie weiter (-190 cal/mol). Die Titration ist von ihrer Intensität mit den vorigen Messungen vergleichbar. Auch ist eine endotherme Verschiebung vorhanden, die deutlicher ausfällt als in der Friulimicin-Ca-DOPC-Messung. Der Einbau der Zielstruktur hat damit wahrscheinlich einen sekundären Effekt auf die Bindung des Friulimicins an die Membran. Bei der gleichzeitigen Anwesenheit von Friulimicin, C55P und Calcium (Abb. 59D) ist erstaunlicherweise eine rein endotherme Reaktion zu verzeichnen (+892 cal/mol), die für eine Peptid-Lipid-Wechselwirkung sehr ungewöhnlich ist. Als Erklärung könnte man den energetischen Aufwand einer konformationellen Änderung des Friulimicins annehmen, die durch das Calcium verursacht wird und durch Bindung des C55P zusätzlich verstärkt wird.

Durch Verschiebungen im Wellenlängenbereich des Friulimicins nach Calciumzugabe lieferten CD-Spektren einen eindeutigen Beweis für Konformationsänderungen des Lipopeptids in Anwesenheit des Calciums, die einen stabilisierenden Effekt auf die Gesamtstruktur haben [223].

Fasst man die gesamte Wärmeänderung in einer kumulierten Form zusammen, so stellt man fest, welche energetischen Einflüsse das Calcium und das C55P jeweils auf die Wärmereaktion zwischen Friulimicin und der Membran aufweisen:

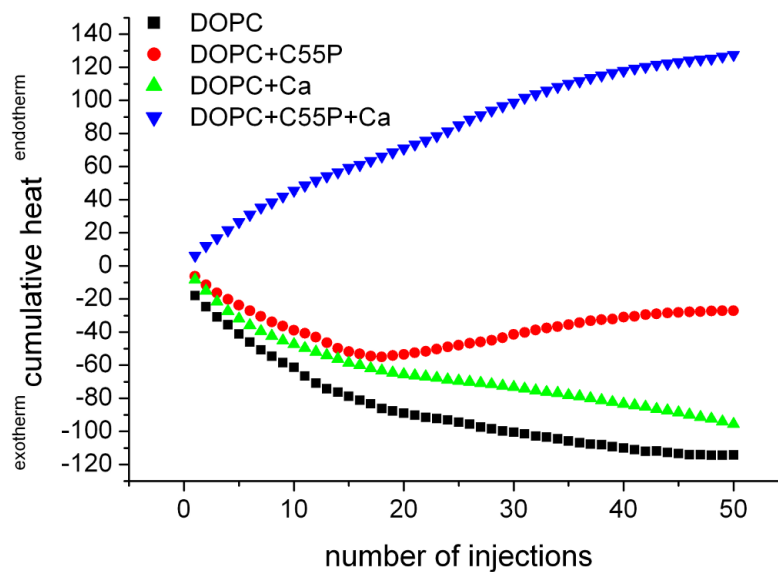


Abbildung 60: Kumulierte Wärmen für die Friulimicinbindung bei DOPC \pm C55P \pm Calcium.

Durch den Calciumzusatz ist die Membraninteraktion des Friulimicins kaum verändert worden. Eine leichte endotherme Verschiebung ist registrierbar. Der Verlauf der Wärmeänderung ist tendenziell gleich geblieben und ist damit in vollem Einklang mit den AFM-Aufnahmen, die für das Friulimicin und das Friulimicin-Ca Aggregate an der Filmschicht abbilden. Das C55P führt ab der 20. Injektion zu einem deutlichen endothermen Shift der Wärmereaktion. Damit steht fest, dass C55P energetische Effekte auf die Membranwechselwirkung des Friulimicins ausübt. Es tritt eine Konkurrenzreaktion zwischen der Eigenassoziation der Friulimicin-Moleküle unter sich und einer Interaktion des Friulimicins mit C55P ein. Dies könnte der Grund für die zurückgedrängte Aggregatbildung sein. Sind alle Voraussetzungen für eine erfolgreiche Bindung des Friulimicin-Calciums an seine Zielstruktur C55P erfüllt, so ist der gesamte Verlauf der thermischen Reaktion im endothermen Bereich. Friulimicin gelangt ladungsunterstützt näher an die Membranoberfläche und komplexiert das C55P. Der enorme Energieaufwand, der kalorimetrisch detektiert wurde, könnte durch starke Anziehungskräfte des Friulimicins zum C55P resultieren. Da Friulimicin nicht in die Membran eintaucht und mit hoher Affinität C55P bindet, ist die elektrostatische Anziehung an der Membranoberfläche deutlich verstärkt.

Eine Tendenz für die Insertion der hydrophoben Seitenkette konnte in keiner Biosensormessung erbracht werden. Zumindest die ITC-Messungen hätten deutliche exotherme Signale ergeben müssen. Eine aktive Funktion der lipophilen Kette für die Bindung an die Membran kann damit ausgeschlossen werden. Somit wird deutlich,

dass möglicherweise mehrere Effekte, wie z.B. die schwache Membranwechselwirkung, eine ladungsinduzierte Aggregation und Dimerenbildung, sowie konformationelle Änderungen abhängig von Faktoren wie Calcium und C55P auftreten.

Mit Hilfe der thermoanalytischen ITC können also nicht nur starke Membranwechselwirkungen identifiziert, sondern auch Formen von Interaktionen aufgedeckt werden, die energetische Veränderungen mit sich ziehen und ein umfassendes Bild über mechanistische Prozesse zeichnen können.

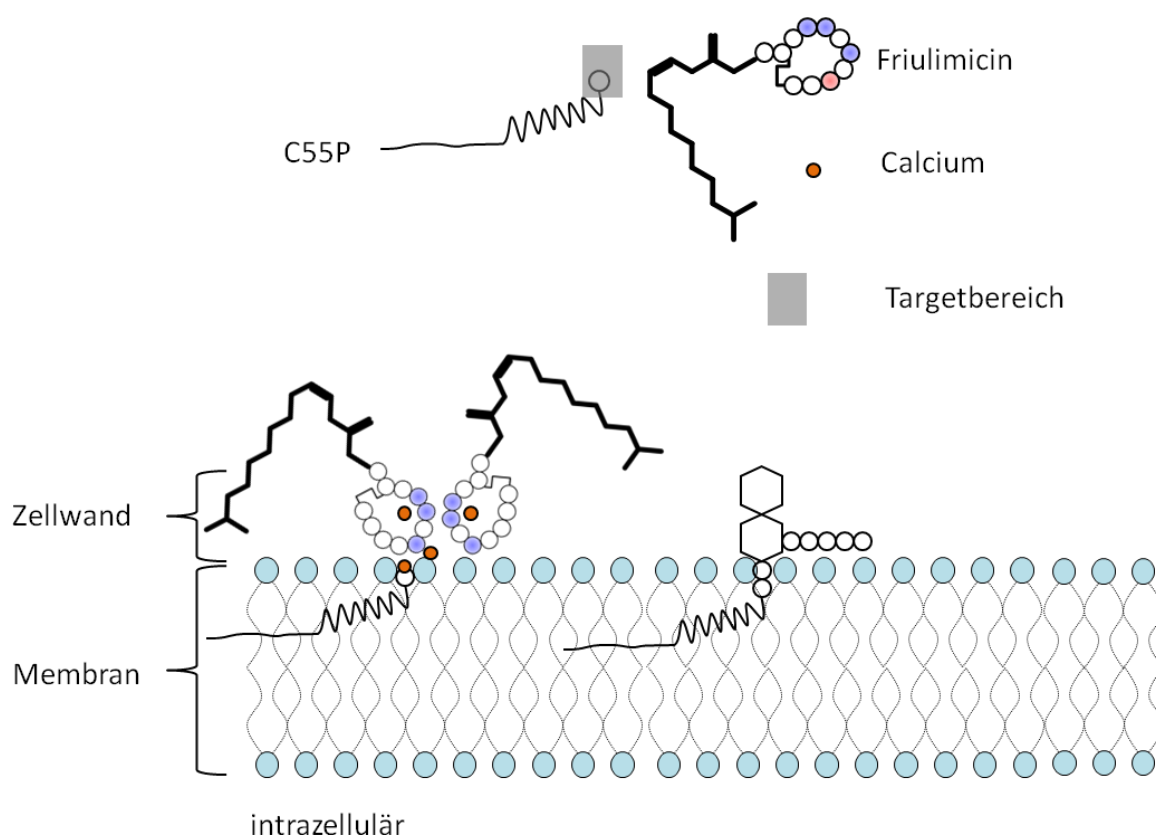


Abbildung 61: Postulierte Effekte zum Wirkmechanismus des Friulimicins.

In diesem Fall konnte der Nachweis für Konformationsänderungen erbracht werden, die Energie für die Umsetzung benötigen. Diese werden nur registriert, wenn Friulimicin, Calcium und die Zielstruktur C55P vorhanden sind. Durch Ausschlussversuche konnte dies demonstriert werden. Ein Einfluss auf das Membranpotential konnte ausgeschlossen werden.

Damit kann der molekulare Wirkmechanismus des Friulimicins an DOPC+C55P-Membranen folgendermaßen postuliert werden:

Tabelle 27: Wirkmechanismus des Friulimicins.

Schritt	Mechanismus
1	Friulimicin-Aggregate werden durch Calcium in eine aktive Dimerform überführt
2	Das Friulimicin-Ca-Salz gelangt ladungsinduziert an die negativ geladene Zellwandvorstufe C55P in der Membran
3	Es findet eine Komplexierung des C55P statt
4	Blockade der Zellwand- und Lipoteichonsäuresynthese
5	Weitere unspezifische Membraninteraktionen treten nicht auf

4.4. Daptomycin

Daptomycin ist ein weiteres anionisches Lipopeptid, dessen Wirkmechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt wurde. In Diskussion stehen mehrere Modelle, die als gemeinsame Kernaussage eine Calcium-Abhängigkeit der Wirkung, sowie eine Interaktion mit der bakteriellen Membran zum Inhalt haben.

Nach dem aktuellen Wissensstand ist es nicht gelungen eine Zielstruktur des Daptomycins in der Bakterienmembran zu evaluieren. Es erscheint daher nicht abwegig anzunehmen, dass auch in diesem Fall unspezifische Membraneffekte zur Wirksamkeit beitragen.

In dieser Arbeit sollen daher die angesprochenen Membraninteraktionen unter Calcium-Einfluss untersucht werden.

4.4.1. Messungen der Bindungskinetik mittels QCM

Die Kinetikmessungen an reinen DOPC-Membranen lieferten auch mit Calciumzusatz keine auswertbaren Daten. Daher wurde in diesem Fall die Modellmembran modifiziert, indem 10 mol% DOPG in die DOPC-Matrix aufgenommen wurden. Zur routinemäßigen Kontrolle wurde auch Lipid II in einem Verhältnis von 0.1 mol% zum Gesamtlipidgehalt eingebaut.

Tabelle 28: QCM-Bindungskinetik für Daptomycin an DOPC/PG ± Lipid II Membranen.

Peptid	Membran	Assoziation [L×mol ⁻¹ ×s ⁻¹]	Dissoziation [s ⁻¹]	Bindungskonstante [mol×L ⁻¹]
Daptomycin	DOPC/PG	2433 ± 517	9.35×10 ⁻⁴ ± 2.62×10 ⁻⁴	3.82×10 ⁻⁷ ± 0.26×10 ⁻⁷
Daptomycin	DOPC/PG+L II	1970 ± 806	2.01×10 ⁻³ ± 1.14×10 ⁻³	1.44×10 ⁻⁶ ± 1.32×10 ⁻⁶

Daptomycin hat eine doppelt verlangsamte Dissoziation von der DOPC/PG-Membran gegenüber der Lipid II-haltigen Membran. Der Einbau von Lipid II in die Membran

verringert somit bei annähernd gleicher Assoziation die Gesamtbindung um den Faktor 3.7. Durch das Lipid II-Molekül wird die Lateraldiffusion der Modellmembran verringert [21]. Diese Eigenschaft wird als Kriterium einer zunehmenden Membranrigidität angesehen. Es kann angenommen werden, dass dadurch die Bindung des Daptomycins deutlich abgeschwächt wird, was sich in diesem Modell in einer verringerten Affinität niederschlägt. Insgesamt hat Daptomycin also eine hohe Affinität zu PG-reichen Membranen, die sich z.B. in den Septen grampositiver Bakterien befinden.

4.4.2. Messungen der Bindungskinetik mittels SAW

In den bisherigen Studien zum Daptomycin wird aufgezeigt, dass eine calciumvermittelte Multimerisierung eintritt. Unklar bleibt, ob in Membrannähe eine zusätzliche Konformationsveränderung stattfindet. Ansatz der SAW-Messungen war daher zunächst die Untersuchung der Konzentrationsabhängigkeit der Daptomycin-Bindung. Als Membranmodell wurden DOPC-Liposomen mit einem Anteil von 10 mol% an negativem DOPG eingesetzt. Zusätzlich wurde eine Messung mit inkorporiertem Lipid II (0.1 mol%) verwendet, um einen Einfluss der Zellwandvorstufe auf die Bindung nochmals zu überprüfen.

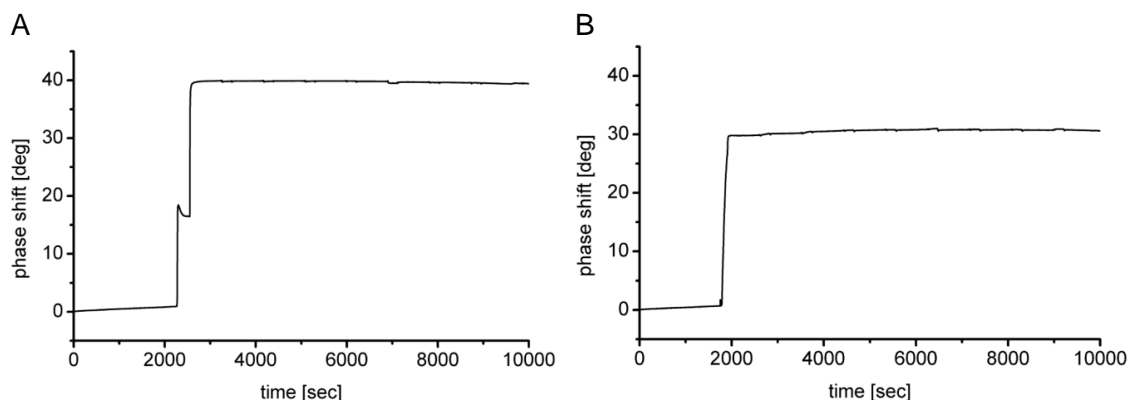


Abbildung 62: SAW-Messung von Daptomycin an DOPC+DOPG (A) und DOPC+DOPG+Lipid II (B).

In der SAW-Messung des Daptomycin an DOPC+DOPG (Abb. 62A) sind im gesamten Konzentrationsbereich keine Anlagerungssignale zu verzeichnen. Trotz einer recht hydrophoben Grundstruktur findet keine Bindung an die Modellmembran statt.

Auch der Einbau von Lipid II (Abb. 62B) führte zu keinem Signalanstieg. Möglicherweise ist durch die negativ geladene PG-Schicht eine Abstoßung des

anionischen Lipopeptids erfolgt, womit keine effektive Annäherung des Daptomycins an die Membran und damit eine Wechselwirkung erfolgen kann.

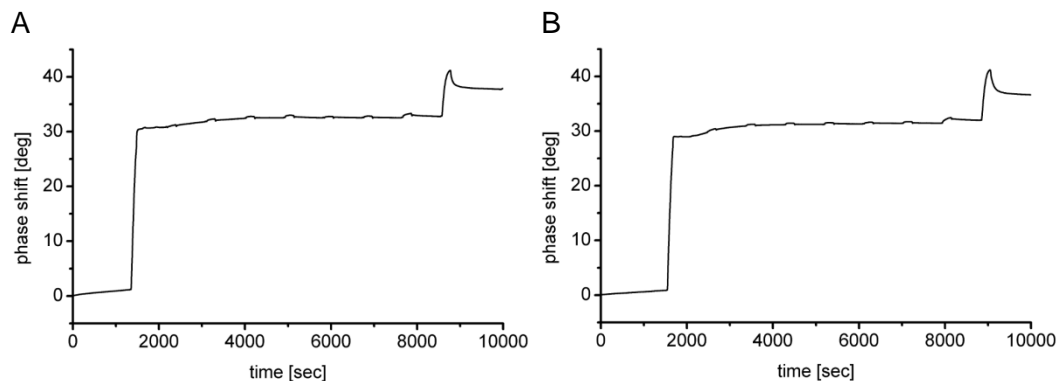


Abbildung 63: SAW-Messung des Daptomycin unter Calciumzusatz an DOPC+DOPG (links) und DOPC+DOPG+Lipid II.

Wird die SAW-Messkammer allerdings vor Peptidzugabe mit einer 1.25 mM Calciumchlorid-Lösung umgepuffert, so ist ein deutlicher Peak zu sehen (8.24°), der allerdings erst bei einer Daptomycin-Konzentration von 10^{-6} M auftritt (Abb. 63A). Dies könnte ein Hinweis sein, dass nicht die monomeren Moleküle mit der Membran in Wechselwirkung treten, sondern eine calciumvermittelte Multimerisierung des Daptomycins für eine erfolgreiche Membranbindung erforderlich ist.

Da auch in der Messung der Bindung an die Lipid II-haltige Membran mit Ca-Puffer erst bei der 10^{-6} M Konzentration (Abb. 63B) ein analoges Signal (8.04°) detektierbar ist, deutet dies auch auf die Unabhängigkeit der Bindung von Lipid II hin.

Ab einer Grenzkonzentration schließen sich möglicherweise mehrere Daptomycin-Moleküle unter Calciumeinfluss zusammen und führen zu einer starken Bindung an die Membran. Durch das Calcium wird die negative Ladung des Daptomycins kompensiert und die Gesamtstruktur wird dadurch hydrophober. Da die QCM-Messungen bei einer fixen Peptidkonzentration von $1.5 \mu\text{M}$ erfolgen müssen, zeigten die Daten in Tab. 28 faktisch das zusammengefasste Bindungsverhalten, welches in der SAW-Messung von 10^{-13} M bis 10^{-6} M differenziert werden kann. Die SAW belegt die Notwendigkeit von Calcium für die Bindung des Daptomycins an Membranen und stellt damit auch einen Zusammenhang zu den verbesserten in vivo Daten bei Calcium-Anwesenheit her. Aus dem Verlauf der SAW-Kurve könnte man vermuten, dass Daptomycin bis zu einer bestimmten Konzentration in Form von Mizellen angeordnet vorliegt, bei der die lipophilen Seitenketten nach innen ragen. Der plötzlich auftretende Peak könnte durch die Umkehr eines Teils der Mizellen in

Membrannähe verursacht sein, bei der die Seitenketten in Wechselwirkung mit der Membran treten. Andernfalls könnte das Signal auch durch die konzentrationsbedingte Dissoziation von Daptomycin-Molekülen aus der Mizelle an die Membran erfolgt sein.

4.4.3. Messungen der Membranaffinität mittels ITC

Um weitere Aufschlüsse über die genaue Rolle der Membran an der Daptomycinwirkung zu erhalten, wurden erstmals ITC-Messungen zur Membraninteraktion des Daptomycons angesetzt. In diesem Fall stand die direkte Wechselwirkung zwischen Lipid und Peptid ohne Ladungseinfluss im Mittelpunkt. Daher wurden keine negativ geladenen Phospholipide berücksichtigt. Die Auswertung der ITC-Kurven ergab folgende Messwerte:

Tabelle 29: ITC-Ergebnisse für Daptomycin an DOPC \pm Ca.

Peptid	Membran	Enthalpie [cal \times mol $^{-1}$]	Entropie [cal \times mol $^{-1}\times$ K $^{-1}$]	Bindungskonstante [mol \times L $^{-1}$]
Daptomycin	DOPC	-3714 \pm 112	2.792 \pm 0.93	4.60 \times 10 $^{-4}$ \pm 0.30 \times 10 $^{-4}$
Daptomycin	DOPC+Ca	-9002 \pm 109	-10.38 \pm 2.41	4.66 \times 10 $^{-5}$ \pm 0.19 \times 10 $^{-5}$

Die Enthalpie ist unter Calciumeinfluss mehr als doppelt so hoch (-9002 cal/mol) als in der reinen DOPC-Membran (-3714 cal/mol). Die Membranbindung ist dadurch deutlich verstärkt. Die Bindungskonstanten beschreiben aufgrund der fehlenden Ladungsinduktion eine moderate Kinetik. Die Affinität zur Membran wird durch Calcium um den Faktor zehn gesteigert und liegt bei 4.66 \times 10 $^{-5}$ mol/L. Interessant in diesem Zusammenhang ist die Entropie, die sich in der DOPC+Ca-Messung (-10.38 cal/mol \times K) dramatisch verändert hat. Die Umkehr des Vorzeichens macht deutlich, dass durch den Calciumzusatz eine eindeutige, räumliche Veränderung an der Lipid-Peptid Grenzfläche eingetreten sein muss. Die Ursache für dieses Phänomen könnte in der Multimerisierung des Daptomycons und der damit verbunden Konformationsänderung liegen.

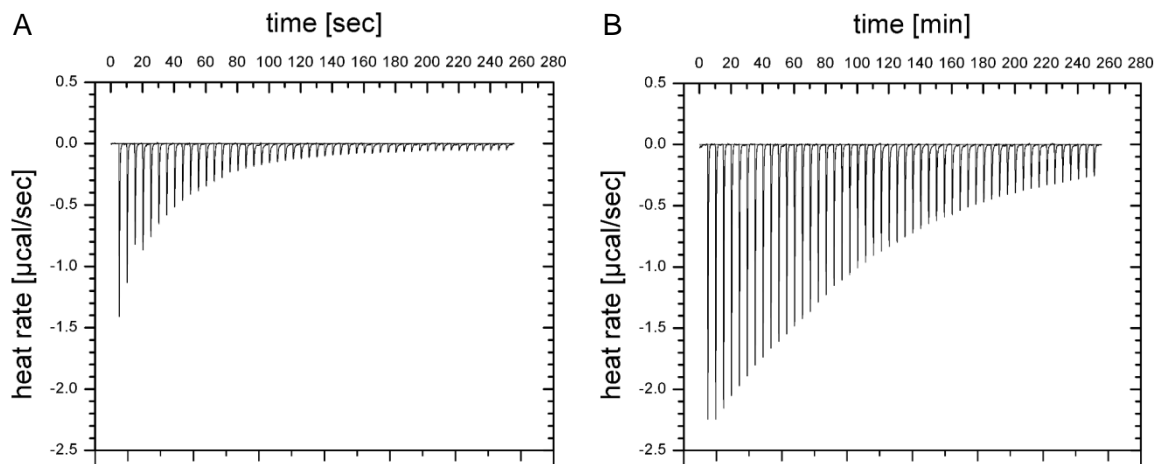


Abbildung 64: ITC-Messung des Daptomycins an DOPC-Vesikeln (A) und DOPC+Calcium-Vesikeln (B).

Die DOPC-Messung des Daptomycins in Abb. 64A zeigt exotherme Peaks, die auf Membraninteraktionen hinweisen. In Anwesenheit des Calciums sind die Signale deutlich verstärkt (Abb. 64B). Der hyperbelförmige Kurvenverlauf lässt auf eine sättigbare Bindung an der Oberfläche der Membran schließen, die im Fall der Calciumpräsenz deutlich langsamer abläuft. An der thermischen Interaktion sind neben der lipophilen Seitenkette möglicherweise auch die hydrophoben Aminosäuren des Daptomycins beteiligt.

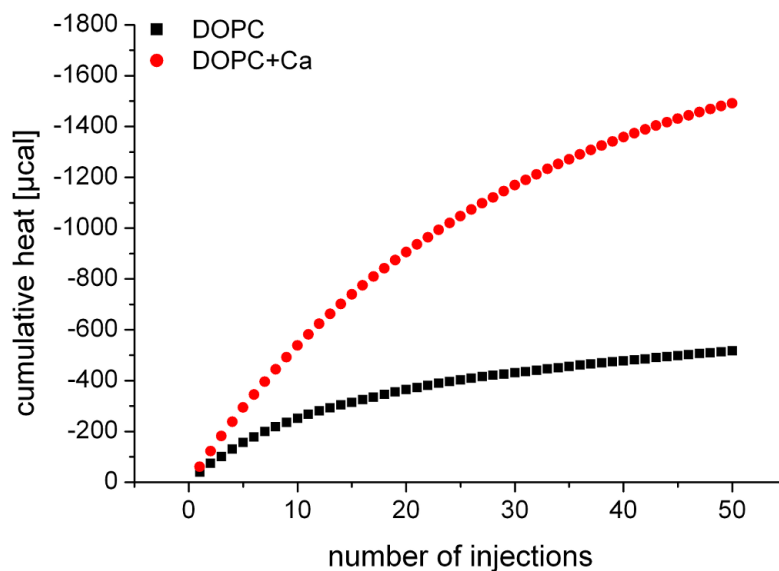


Abbildung 65: Kumulative Wärmen der ITC-Messungen von Daptomycin an DOPC \pm Ca.

Durch Auftragung der kumulierten Wärmen wird der Calciumeffekt für die Daptomycin-Membranbindung sehr deutlich.

Die Wechselwirkung des Daptomycins wird durch Calcium in der Intensität deutlich gesteigert. Neben der Verringerung des Ladungseffektes und einer erhöhten

Lipophilie, sind konformationelle Änderungen infolge von Multimerisierungen für eine verstärkte Membranbindung förderlich.

4.4.4. Auswertung Daptomycin

Die Zielstruktur des Daptomycins wurde bisher nicht aufgeklärt, auch wenn es hierzu interessante Thesen gibt, die eine Beteiligung des YycG an der Wirkung vermuten [210]. In dieser Arbeit wurden die Calciumabhängigkeit und die Membranaffinität untersucht. Durch das Calcium kommt es offensichtlich zu einer Multimerisierung mehrerer Daptomycin-Moleküle. Durch den amphoteren Aufbau des Daptomycins ist eine Anordnung in Form von Mizellen begünstigt, bei der die Seitenketten zunächst ins Innere eingeschlossen wären [207,233]. Zusätzlich überbrückt Calcium die negative Nettoladung der Daptomycin-Multimere und ermöglicht so eine Anlagerung an negativ geladene Membranbereiche. Ab einer bestimmten Grenzkonzentration könnten einige Daptomycin-Moleküle aus der Mizelle dissoziieren und an die Membran binden. Eine andere Variante wäre die partielle Umkehr der Mizellen in Membrannähe, welche mit einer deutlich erhöhten Hydrophobie einhergehen würde. Damit wären die polaren Bereiche verstärkt durch Calcium im Inneren der Mizellen und die lipophilen Seitenketten würden den Außenbereich bilden. Es steht fest, daß Daptomycin unspezifische Interaktionen mit Membranen bildet, die durch Calcium in ihrem Ausmaß gesteigert werden. Die Funktionalität der bakteriellen Membran wird somit ohne aktive Eingriffe in die Synthese der Zellwand gestört. Elektronenmikroskopische Aufnahmen belegen morphologische Veränderungen, ohne dass die Membran zerstört wird [234].

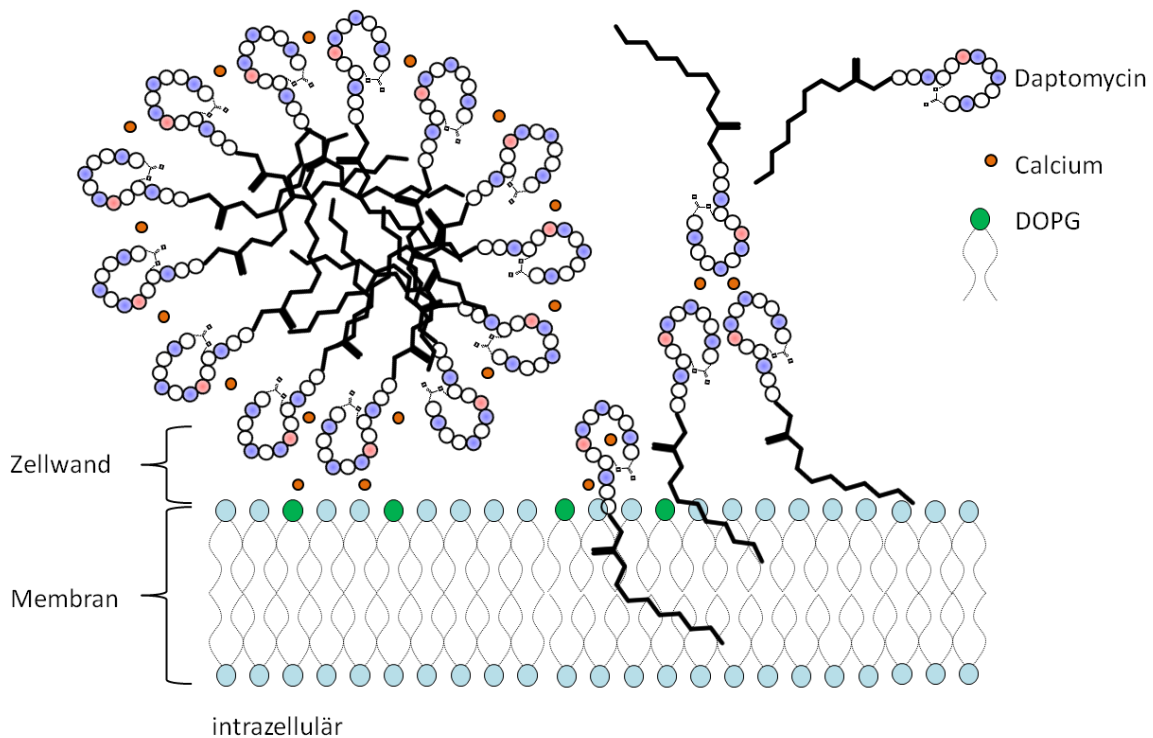


Abbildung 66: Postulierter Wirkmechanismus des Daptomycins.

Für das Daptomycin wird anhand der ausgewerteten Biosensordaten folgender Wirkmechanismus vorgeschlagen:

Tabelle 30: Wirkmechanismus des Daptomycins.

Schritt	Mechanismus
1	Calcium lagert sich in die Bindungstasche des Daptomycin-Moleküls ein
2	Es entstehen Multimere, die mizellartig angeordnet sind
3	Die Calcium-assoziierten Multimere nähern sich ladungsunterstützt der bakteriellen Membran
4a	Aus den Mizellen dissoziieren Daptomycin-Moleküle an die Membran
4b	Die Mizellen kehren sich um und die lipophilen Seitenketten ragen damit nach außen
5	Daptomycin bindet dank der hydrophoben Seitenkette an die Membran. Durch Calcium wird die Bindung verstärkt
6	Die bakterielle Membran wird in Ihrer Funktion beeinträchtigt

Betrachtet man Daptomycin im Vergleich zum Friulimicin, so sind die geladenen Aminosäuren im Daptomycin anders verteilt. Während die negativen Ladungen im Friulimicin sehr konzentriert an den Positionen 4, 5 und 7 vorliegen, so sind diese bei Daptomycin an den AS 3, 7, 9 und 12. Damit trägt Daptomycin eine zusätzliche negative Nettoladung. Beide Lipopeptide besitzen die Calcium-Bindungsstelle mit der Sequenz „Asp-[]-Asp-Gly“. Der Effekt des Calciums auf die Lipopeptide ist aber

dennoch unterschiedlich. Damit zeigt sich, dass trotz ähnlichem Aufbau, geringe strukturelle Unterschiede einen großen Einfluss auf die molekularen Eigenschaften der Peptide haben.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Dissertation wird eindrucksvoll das Potential der biosensorischen Messmethoden bei der Untersuchung der Wechselwirkung von Peptidantibiotika an Modellmembranen zur Simulation der Bakterienmembranen demonstriert. Die erstmals in dieser Arbeit vorgestellte Kombination der massesensitiven Biosensoren (QCM und SAW) mit der ITC liefert wertvolle Einblicke in die molekularen Wirkmechanismen der Peptidantibiotika und erweitert das Verständnis für die Abläufe an der Lipid-Peptid-Grenzfläche.

Die bewährte QCM hat erneut ihre Wichtigkeit in der Ermittlung kinetischer Bindungsparameter bestätigt. Mit der SAW ist ein weiterer massesensitiver Biosensor etabliert worden, der in Abhängigkeit der eingesetzten Antibiotikakonzentrationen qualitativ unterschiedliche Formen der Membranwechselwirkung detektieren kann. Die thermodynamische ITC hat auf dem Gebiet der Wärmedetektion von Membranwechselwirkungen bedeutende Informationen geliefert.

Im Rahmen der Erfassung der antimikrobiellen Aktivität der untersuchten Antibiotika musste für die Simulierung der bakteriellen Membran hinsichtlich der gewählten Modellmembranen ein Kompromiss eingegangen werden, um einerseits ein möglichst einfaches und realistisches Modell der grampositiven Bakterienmembran zu erhalten und um andererseits die molekularen Mechanismen genügend beschreiben zu können.

Der zentralen Fragestellung der vorliegenden Dissertation, inwieweit unspezifische Interaktionen von Peptidantibiotika mit simulierten grampositiven Bakterienmembranen quantifizierbar sind und einen Einfluss auf die biologische Wirksamkeit ausüben, konnten neue Aspekte hinzugefügt werden. Bei der Interaktion mit Membranen spielen demnach folgende strukturelle Faktoren eine entscheidende Rolle:

- Die Ladung und die Ladungsverteilung im Molekül bestimmen, ob ein Peptid in Kontakt mit einer Membran treten kann.
- Hydrophobe Bereiche in der Antibiotikastruktur verstärken die Membraninteraktion.
- Konformationelle Änderungen führen zu einer flexibleren Anpassung des Peptids an die Gegebenheiten der Membranarchitektur.

- Mit einer Dimerisierung bzw. Multimerisierung geht meist auch eine Konformationsänderung einher, und diese kann eine Voraussetzung für eine Wechselwirkung darstellen.

Im Folgenden werden die erhaltenen Messergebnisse und individuellen Interpretationen für jedes, im Rahmen dieser Dissertation, untersuchte Peptid-antibiotikum zusammengefasst:

- Gallidermin

Es konnte der Beweis erbracht werden, dass Gallidermin definitiv Lipid II bindet und sich gleichzeitig in die Membran einlagert. Die Problematik vorangegangener Biosensorstudien, in denen die Lipid II-Bindung überlagert wurde, konnte damit gelöst werden. Gallidermin verfügt demnach über einen zusätzlichen unspezifischen Mechanismus, der in vivo für die verbesserte Wirksamkeit verantwortlich sein könnte.

- Vancomycin

Für das Vancomycin konnte eindeutig die Lipid II-Abhängigkeit der Bindung simuliert werden. Eine Interferenz mit der Membran konnte mit unseren Techniken ausgeschlossen werden. Es ist anzunehmen, dass durch die fehlende Membraninteraktion die auftretenden Wirkunterschiede zwischen Gallidermin und Vancomycin zu erklären sind.

- Telavancin

Im Gegensatz zum Vancomycin zeigte das modifizierte Glykopeptid Telavancin, bedingt durch eine Aminodecyl-Seitenkette, neben der Bindung an Lipid II auch hydrophobe Wechselwirkungen mit der Membran, die offensichtlich entscheidend für die erhöhte antimikrobiellen Aktivität im Vergleich zum Vancomycin sind.

- Friulimicin

Die Calciumabhängigkeit der Bindung des Lipopeptids Friulimicins an C55P wurde bestätigt. Die Beteiligung weiterer Membraninteraktionen an der Wirkung konnte aufgrund der ITC-Daten ausgeschlossen werden. Die konformationelle Dimerbildung des Friulimicins in Anwesenheit von Calcium-Ionen erscheint als die energetische Voraussetzung für eine erfolgreiche Bindung an die Zielstruktur C55P.

- Daptomycin

Das Lipopeptid bildet calciumunterstützt Multimere und lagert sich ladungsinduziert an die Membran an. Auch ohne eine spezielle Zielstruktur zu besitzen, kann

Daptomycin eine starke Wechselwirkung mit der Membran eingehen. Auch wenn auf dem Gebiet des Daptomycins noch weitreichende Informationen fehlen, kann man postulieren, dass die hier gezeigte calciumabhängige Membraninteraktion einen wichtigen Bestandteil der antimikrobiellen Wirkung darstellt.

Es kann resümiert werden, dass die in dieser Arbeit verwendeten Modellmembransysteme in Kombination mit unterschiedlichen analytischen Techniken wertvolle Beiträge für die Aufklärung der antibiotischen Wirkmechanismen leisten können. Die Aussagekraft der biosensorischen Daten sind modellspezifischer Natur, können jedoch durch die Kombination mit den klassischen mikrobiologischen Assays neue Wege der antimikrobiellen Forschung beschriftet werden.

6. Literatur

- [1] GKV Arzneimittelindex, Wissenschaftliches Institut der AOK, 2008.
- [2] U. Schwabe, D. Paffrath, Arzneiverordnungsreport 2008, Springer Verlag, 2008.
- [3] Basisdaten der stationären Krankenhausversorgung in Deutschland – nosokomiale Infektionen, Robert-Koch Institut, 2010.
- [4] IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed., Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1997.
- [5] C. Campbell, T. de Lumley-Woodyear, A. Heller, Towards immunoassay in whole blood: separationless sandwich-type electrochemical immunoassay based on in-situ generation of the substrate of the labeling enzyme, *Fresenius J Anal Chem.* 364 (1999) 165-169.
- [6] J. Polster, G. Prestel, M. Wollenweber, G. Kraus, G. Gauglitz, Simultaneous determination of penicillin and ampicillin by spectral fibre-optical enzyme optodes and multivariate data analysis based on transient signals obtained by flow injection analysis, *Talanta.* 42 (1995) 2065-2072.
- [7] J. Piehler, A. Brecht, G. Gauglitz, M. Zerlin, C. Maul, R. Thiericke, et al., Label-free monitoring of DNA-ligand interactions, *Anal. Biochem.* 249 (1997) 94-102.
- [8] D.R. Thévenot, K. Toth, R.A. Durst, G.S. Wilson, Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification, *Biosens Bioelectron.* 16 (2001) 121-131.
- [9] S. Rodriguez-Mozaz, M.-P. Marco, M.J. Lopez de Alda, D. Barceló, Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article, *Anal Bioanal Chem.* 378 (2004) 588-598.
- [10] L. Clark, C. Lyons, Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 102 (1962) 29-45.
- [11] J. Curie, P. Curie, Piezoelectric and allied phenomena in Rochelle salt, *Comput Rend Acad Sci Paris.* 91 (1880) 294-297.
- [12] G. Lippman, Sur le principe de la conversation de l'électricité ou second principe de la théorie des phénomènes électriques, *Comput Rend Acad Sci Paris.* 92 (1881) 1049-1051.
- [13] Janshoff, Galla, Steinem, Piezoelectric Mass-Sensing Devices as Biosensors-An Alternative to Optical Biosensors?, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 39 (2000) 4004-4032.
- [14] K.A. Marx, Quartz crystal microbalance: a useful tool for studying thin polymer films and complex biomolecular systems at the solution-surface interface, *Biomacromolecules.* 4 (2003) 1099-1120.
- [15] J. Wegener, A. Janshoff, C. Steinem, The quartz crystal microbalance as a novel means to study cell-substrate interactions in situ, *Cell Biochem. Biophys.* 34 (2001) 121-151.
- [16] G. Sauerbrey, Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung, *Z. Phys.* 155 (1959) 206-222.
- [17] K.K. Kanazawa, J.G. Gordon, Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid, *Analytical Chemistry.* 57 (1985) 1770-1771.
- [18] M. Minunni, M. Mascini, G.G. Guilbault, B. Hock, The Quartz Crystal Microbalance as Biosensor. A Status Report on Its Future, *Anal Lett.* 28 (1995) 749-764.
- [19] R.D. Vaughan, C.K. O'Sullivan, G.G. Guilbault, Sulfur based self-assembled monolayers (SAM's) on piezoelectric crystals for immunosensor development, *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry.* 364 (1999) 54-57.
- [20] D. Simonis, J. Fritzsche, S. Alban, G. Bendas, Kinetic analysis of heparin and glucan sulfates binding to P-selectin and its impact on the general understanding of selectin inhibition, *Biochemistry.* 46 (2007) 6156-6164.
- [21] K. Christ, I. Wiedemann, U. Bakowsky, H.-G. Sahl, G. Bendas, The role of lipid II in membrane binding of and pore formation by nisin analyzed by two combined biosensor techniques, *Biochim. Biophys. Acta.* 1768 (2007) 694-704.
- [22] T.M.A. Gronewold, Surface acoustic wave sensors in the bioanalytical field: recent trends and challenges, *Anal. Chim. Acta.* 603 (2007) 119-128.

- [23] L. Rayleigh, On the Free Vibrations of an Infinite Plate of Homogeneous Isotropic Elastic Matter., *Proc London Math Soc.* 20 (1889) 225-226.
- [24] K. Länge, B.E. Rapp, M. Rapp, Surface acoustic wave biosensors: a review, *Anal Bioanal Chem.* 391 (2008) 1509-1519.
- [25] M.J. Vellekoop, G.W. Lubking, P.M. Sarro, A. Venema, Integrated-circuit-compatible design and technology of acoustic-wave-based microsensors, *Sensors and Actuators A: Physical.* 44 (1994) 249-263.
- [26] A.E.H. Love, Some problems of geodynamics: being an essay to which the Adams prize in the University of Cambridge was adjudged in 1911, Cornell University Library, 1911.
- [27] E. Gizeli, N.J. Goddard, C.R. Lowe, A.C. Stevenson, A Love plate biosensor utilising a polymer layer, *Sensors and Actuators B: Chemical.* 6 (1992) 131-137.
- [28] G.L. Harding, J. Du, P.R. Dencher, D. Barnett, E. Howe, Love wave acoustic immunosensor operating in liquid, *Sensors and Actuators A: Physical.* 61 (1997) 279-286.
- [29] M.D. Schlensog, T.M.A. Gronewold, M. Tewes, M. Famulok, E. Quandt, A Love-wave biosensor using nucleic acids as ligands, *Sensors and Actuators B: Chemical.* 101 (2004) 308-315.
- [30] M.A. Cooper, Label-free screening of bio-molecular interactions, *Anal Bioanal Chem.* 377 (2003) 834-842.
- [31] E. Gizeli, M. Liley, C.R. Lowe, H. Vogel, Antibody binding to a functionalized supported lipid layer: a direct acoustic immunosensor, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4808-4813.
- [32] T.M.A. Gronewold, A. Baumgartner, E. Quandt, M. Famulok, Discrimination of single mutations in cancer-related gene fragments with a surface acoustic wave sensor, *Anal. Chem.* 78 (2006) 4865-4871.
- [33] Y. Inoue, Y. Kato, K. Sato, Surface acoustic wave method for in situ determination of the amounts of enzyme-substrate complex formed on immobilized glucose oxidase during catalytic reaction, *J Chem Soc Faraday Trans.* 88 (1992) 449-454.
- [34] J. Andrä, A. Böhlring, T.M.A. Gronewold, U. Schlecht, M. Perpeet, T. Gutschmann, Surface acoustic wave biosensor as a tool to study the interaction of antimicrobial peptides with phospholipid and lipopolysaccharide model membranes, *Langmuir.* 24 (2008) 9148-9153.
- [35] G. Henze, *Polarographie und Voltammetrie: Grundlagen und analytische Praxis*, 1st ed., Springer, Berlin, 2001.
- [36] D.A. Skoog, J.J. Leary, *Instrumentelle Analytik: Grundlagen, Geräte, Anwendungen*, 1st ed., Springer, Berlin, 2010.
- [37] P.T. Kissinger, W.R. Heineman, Cyclic voltammetry, *Journal of Chemical Education.* 60 (1983) 702.
- [38] A. Dominik, D. Steinhilber, *Instrumentelle Analytik: Kurzlehrbuch und kommentierte Originalfragen für Pharmazeuten*, 2nd ed., Deutscher Apotheker Verlag, 2002.
- [39] X. Chen, P. He, P.T. Kissinger, Oxidation pathways of physostigmine, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry.* 284 (1990) 371-383.
- [40] K. Christ, S. Al-Kaddah, I. Wiedemann, B. Rattay, H.-G. Sahl, G. Bendas, Membrane lipids determine the antibiotic activity of the lantibiotic gallidermin, *J. Membr. Biol.* 226 (2008) 9-16.
- [41] P. Atkins, J. de Paula, *Physikalische Chemie*, 4th ed., Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
- [42] P.W. Atkins, *Kurzlehrbuch Physikalische Chemie*, 3rd ed., Wiley-VCH, 2001.
- [43] H.D. Baehr, S. Kabelac, *Thermodynamik: Grundlagen und technische Anwendungen*, 14th ed., Springer, Berlin, 2009.
- [44] A. Lavoisier, P. Laplace, Memoire sur la Chaleur, *Mem Acad Roy Sci.* (1780) 355-408.
- [45] J.J. Christensen, R.M. Izatt, L.D. Hansen, J.A. Partridge, Entropy Titration. A Calorimetric Method for the Determination of ΔG , ΔH , and ΔS from a Single Thermometric Titration^{1a,b}, *The Journal of Physical Chemistry.* 70 (1966) 2003-2010.
- [46] N.V. Beaudette, N. Langerman, An improved method for obtaining thermal titration curves using micromolar quantities of protein, *Analytical Biochemistry.* 90 (1978) 693-704.
- [47] T. Wiseman, S. Williston, J.F. Brandts, L.N. Lin, Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter, *Anal. Biochem.* 179 (1989) 131-137.

- [48] M.W. Freyer, E.A. Lewis, Isothermal titration calorimetry: experimental design, data analysis, and probing macromolecule/ligand binding and kinetic interactions, *Methods Cell Biol.* 84 (2008) 79-113.
- [49] M.M. Pierce, C.S. Raman, B.T. Nall, Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions, *Methods.* 19 (1999) 213-221.
- [50] A.L. Feig, Applications of isothermal titration calorimetry in RNA biochemistry and biophysics, *Biopolymers.* 87 (2007) 293-301.
- [51] G. Kloczek, J. Seelig, Melittin interaction with sulfated cell surface sugars, *Biochemistry.* 47 (2008) 2841-2849.
- [52] M. Brockhaus, P. Ganz, W. Huber, B. Bohrmann, H.-R. Loetscher, J. Seelig, Thermodynamic studies on the interaction of antibodies with beta-amyloid peptide, *J Phys Chem B.* 111 (2007) 1238-1243.
- [53] M.R. Wenk, J. Seelig, Magainin 2 amide interaction with lipid membranes: calorimetric detection of peptide binding and pore formation, *Biochemistry.* 37 (1998) 3909-3916.
- [54] G. Machaidze, J. Seelig, Specific binding of cinnamycin (Ro 09-0198) to phosphatidylethanolamine. Comparison between micellar and membrane environments, *Biochemistry.* 42 (2003) 12570-12576.
- [55] F. Bringezu, S. Wen, S. Dante, T. Hauss, M. Majerowicz, A. Waring, The insertion of the antimicrobial peptide dicynthaurin monomer in model membranes: thermodynamics and structural characterization, *Biochemistry.* 46 (2007) 5678-5686.
- [56] V.V. Andrushchenko, M.H. Aarabi, L.T. Nguyen, E.J. Prenner, H.J. Vogel, Thermodynamics of the interactions of tryptophan-rich cathelicidin antimicrobial peptides with model and natural membranes, *Biochim. Biophys. Acta.* 1778 (2008) 1004-1014.
- [57] H. Binder, G. Lindblom, Charge-dependent translocation of the Trojan peptide penetratin across lipid membranes, *Biophys. J.* 85 (2003) 982-995.
- [58] E. Breukink, P. Ganz, B. de Kruijff, J. Seelig, Binding of Nisin Z to bilayer vesicles as determined with isothermal titration calorimetry, *Biochemistry.* 39 (2000) 10247-10254.
- [59] M. Rekharsky, D. Hesek, M. Lee, S.O. Meroueh, Y. Inoue, S. Mobashery, Thermodynamics of interactions of vancomycin and synthetic surrogates of bacterial cell wall, *J. Am. Chem. Soc.* 128 (2006) 7736-7737.
- [60] G. Kloczek, T. Schulthess, Y. Shai, J. Seelig, Thermodynamics of melittin binding to lipid bilayers. Aggregation and pore formation, *Biochemistry.* 48 (2009) 2586-2596.
- [61] J. Seelig, Titration calorimetry of lipid-peptide interactions, *Biochim. Biophys. Acta.* 1331 (1997) 103-116.
- [62] J. Seelig, Thermodynamics of lipid-peptide interactions, *Biochim. Biophys. Acta.* 1666 (2004) 40-50.
- [63] G. Gouy, Sur la constitution de la charge électrique a la surface d'un électrolyte, *J. Phys. Theor. Appl.* 9 (1910) 455-468.
- [64] D. Chapman, A contribution to the theory of electrocapillarity, *Philos Mag.* 25 (1913) 475.
- [65] D.C. Grahame, The Electrical Double Layer and the Theory of Electrocapillarity., *Chemical Reviews.* 41 (1947) 441-501.
- [66] M. Eisenberg, T. Gresalfi, T. Riccio, S. McLaughlin, Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids, *Biochemistry.* 18 (1979) 5213-5223.
- [67] S. McLaughlin, N. Mulrine, T. Gresalfi, G. Vaio, A. McLaughlin, Adsorption of divalent cations to bilayer membranes containing phosphatidylserine, *J. Gen. Physiol.* 77 (1981) 445-473.
- [68] S. McLaughlin, The electrostatic properties of membranes, *Annu Rev Biophys Biophys Chem.* 18 (1989) 113-136.
- [69] S. Waksman, Definition of antibiotic, *Int Rec Med Gen Pract Clin.* 169 (1956) 87-88.
- [70] G. Lancini, F. Parenti, *Antibiotics: An Integrated View*, Springer Verlag, Berlin, 1982.
- [71] D. Steinhilber, M. Schubert-Zsilavecz, H.J. Roth, *Medizinische Chemie: Targets und Arzneistoffe: Targets - Arzneistoffe - Chemische Biologie*, 2nd ed., Deutscher Apotheker Verlag, 2010.

- [72] E. Mutschler, G. Geisslinger, H.K. Kroemer, P. Ruth, M. Schäfer-Korting, Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsges., 2008.
- [73] Z. Wang, G. Wang, APD: the Antimicrobial Peptide Database, *Nucleic Acids Res.* 32 (2004) D590-592.
- [74] G. Wang, X. Li, Z. Wang, APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design, *Nucleic Acids Res.* 37 (2009) D933-937.
- [75] T. Schneider, H.-G. Sahl, An oldie but a goodie - cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway, *Int. J. Med. Microbiol.* 300 (2010) 161-169.
- [76] G. Bierbaum, H.-G. Sahl, Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering, *Curr Pharm Biotechnol.* 10 (2009) 2-18.
- [77] C. Chatterjee, M. Paul, L. Xie, W.A. van der Donk, Biosynthesis and Mode of Action of Lantibiotics, *Chemical Reviews.* 105 (2005) 633-684.
- [78] H.G. Sahl, G. Bierbaum, Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from gram-positive bacteria, *Annu. Rev. Microbiol.* 52 (1998) 41-79.
- [79] G. Jung, Lantibiotics—Ribosomally Synthesized Biologically Active Polypeptides containing Sulfide Bridges and α,β -Didehydroamino Acids, *Angew Chem Int Ed Engl.* 30 (1991) 1051-1068.
- [80] J.-C. Piard, P.M. Muriana, M.J. Desmazeaud, T.R. Klaenhammer, Purification and Partial Characterization of Lacticin 481, a Lanthionine-Containing Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481, *Appl Environ Microbiol.* 58 (1992) 279-284.
- [81] W.M. de Vos, O.P. Kuipers, J.R. van der Meer, R.J. Siezen, Maturation pathway of nisin and other lantibiotics: post-translationally modified antimicrobial peptides exported by gram-positive bacteria, *Mol. Microbiol.* 17 (1995) 427-437.
- [82] S.M. Asaduzzaman, K. Sonomoto, Lantibiotics: diverse activities and unique modes of action, *J. Biosci. Bioeng.* 107 (2009) 475-487.
- [83] S. Kodani, M.E. Hudson, M.C. Durrant, M.J. Buttner, J.R. Nodwell, J.M. Willey, The SapB morphogen is a lantibiotic-like peptide derived from the product of the developmental gene *ramS* in *Streptomyces coelicolor*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101 (2004) 11448-11453.
- [84] S. Kodani, M.A. Lodato, M.C. Durrant, F. Picart, J.M. Willey, SapT, a lanthionine-containing peptide involved in aerial hyphae formation in the streptomycetes, *Mol. Microbiol.* 58 (2005) 1368-1380.
- [85] S. Keller, H. Gühring, L. Vértessy, J. Wink, H. Hoffmann, M. Brönstrup, et al., Labyrinthopeptins: a new class of carbacyclic lantibiotics, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 49 (2010) 1151-1154.
- [86] W.M. Müller, T. Schmiederer, P. Ensle, R.D. Süssmuth, In Vitro Biosynthesis of the Prepeptide of Type-III Lantibiotic Labyrinthopeptin A2 Including Formation of a C--C Bond as a Post-Translational Modification, *Angew Chem Int Ed Engl.* 49 (2010) 2436-2440.
- [87] N.I. Martin, T. Sprules, M.R. Carpenter, P.D. Cotter, C. Hill, R.P. Ross, et al., Structural characterization of lacticin 3147, a two-peptide lantibiotic with synergistic activity, *Biochemistry.* 43 (2004) 3049-3056.
- [88] M.A. Navaratna, H.G. Sahl, J.R. Tagg, Two-component anti-*Staphylococcus aureus* lantibiotic activity produced by *Staphylococcus aureus* C55, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 4803-4808.
- [89] H. Holo, Z. Jeknic, M. Daeschel, S. Stevanovic, I.F. Nes, Plantaricin W from *Lactobacillus plantarum* belongs to a new family of two-peptide lantibiotics, *Microbiology (Reading, Engl.)*. 147 (2001) 643-651.
- [90] A.L. McClerren, L.E. Cooper, C. Quan, P.M. Thomas, N.L. Kelleher, W.A. van der Donk, Discovery and in vitro biosynthesis of haloduracin, a two-component lantibiotic, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103 (2006) 17243-17248.
- [91] J.W. Mulders, I.J. Boerrigter, H.S. Rollema, R.J. Siezen, W.M. de Vos, Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant, *Eur. J. Biochem.* 201 (1991) 581-584.

- [92] E. Gross, H.H. Kiltz, E. Nebelin, The structure of subtilin, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354 (1973) 810-812.
- [93] F. Castiglione, A. Lazzarini, L. Carrano, E. Corti, I. Ciciliato, L. Gastaldo, et al., Determining the structure and mode of action of microbisporicin, a potent lantibiotic active against multiresistant pathogens, Chem. Biol. 15 (2008) 22-31.
- [94] R. Kellner, G. Jung, T. Hörner, H. Zähler, N. Schnell, K.D. Entian, et al., Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic, Eur. J. Biochem. 177 (1988) 53-59.
- [95] J.D. Hillman, J. Novák, E. Sagura, J.A. Gutierrez, T.A. Brooks, P.J. Crowley, et al., Genetic and biochemical analysis of mutacin 1140, a lantibiotic from *Streptococcus mutans*, Infect. Immun. 66 (1998) 2743-2749.
- [96] C. Kaletta, K.D. Entian, R. Kellner, G. Jung, M. Reis, H.G. Sahl, Pep5, a new lantibiotic: structural gene isolation and prepeptide sequence, Arch. Microbiol. 152 (1989) 16-19.
- [97] J.C. Piard, O.P. Kuipers, H.S. Rollema, M.J. Desmazeaud, W.M. de Vos, Structure, organization, and expression of the *lct* gene for lactacin 481, a novel lantibiotic produced by *Lactococcus lactis*, J. Biol. Chem. 268 (1993) 16361-16368.
- [98] D.L. Turner, L. Brennan, H.E. Meyer, C. Lohaus, C. Siethoff, H.S. Costa, et al., Solution structure of plantaricin C, a novel lantibiotic, Eur. J. Biochem. 264 (1999) 833-839.
- [99] S. Chatterjee, S. Chatterjee, S.J. Lad, M.S. Phansalkar, R.H. Rupp, B.N. Ganguli, et al., Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. Fermentation, isolation, purification and chemical characterization, J. Antibiot. 45 (1992) 832-838.
- [100] N. Zimmermann, J.W. Metzger, G. Jung, The tetracyclic lantibiotic actagardine. ¹H-NMR and ¹³C-NMR assignments and revised primary structure, Eur. J. Biochem. 228 (1995) 786-797.
- [101] A. Fredenhagen, G. Fendrich, F. Märki, W. Märki, J. Gruner, F. Raschdorf, et al., Duramycins B and C, two new lanthionine containing antibiotics as inhibitors of phospholipase A2. Structural revision of duramycin and cinnamycin, J. Antibiot. 43 (1990) 1403-1412.
- [102] L.A. Rogers, The inhibitory effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*, J. Bacteriol. 16 (1928) 321-325.
- [103] A. Mattick, A. Hirsch, A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci, Nature. 154 (1944) 551.
- [104] A. Mattick, A. Hirsch, Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci, Lancet. 2 (1947) 5-8.
- [105] E. Gross, J.L. Morell, The presence of dehydroalanine in the antibiotic nisin and its relationship to activity, J. Am. Chem. Soc. 89 (1967) 2791-2792.
- [106] E. Gross, J.L. Morell, The number and nature of alpha,beta-unsaturated amino acids in nisin, FEBS Lett. 2 (1968) 61-64.
- [107] E. Gross, J.L. Morell, L.C. Craig, Dehydroalanyllysine: identical COOH-terminal structures in the peptide antibiotics nisin and subtilin, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 62 (1969) 952-956.
- [108] E. Gross, J.L. Morell, Nisin. The assignment of sulfide bridges of beta-methyllanthionine to a novel bicyclic structure of identical ring size, J. Am. Chem. Soc. 92 (1970) 2919-2920.
- [109] E. Gross, J.L. Morell, The structure of nisin, J. Am. Chem. Soc. 93 (1971) 4634-4635.
- [110] G.W. Buchman, S. Banerjee, J.N. Hansen, Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic, J. Biol. Chem. 263 (1988) 16260-16266.
- [111] M. Barber, G.J. Elliot, R.S. Bordoli, B.N. Green, B.W. Bycroft, Confirmation of the structure of nisin and its major degradation product by FAB-MS and FAB-MS/MS, Experientia. 44 (1988) 266-270.
- [112] G. Jung, H. Sahl, Nisin and Novel Lantibiotics, ESCOM Verlag, Niederlande, 1991.
- [113] E. Breukink, B. de Kruijff, Lipid II as a target for antibiotics, Nat Rev Drug Discov. 5 (2006) 321-332.
- [114] A. Okereke, T.J. Montville, Nisin dissipates the proton motive force of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA 3679, Appl. Environ. Microbiol. 58 (1992) 2463-2467.
- [115] J. Delves-Broughton, P. Blackburn, R.J. Evans, J. Hugenholtz, Applications of the bacteriocin, nisin, Antonie Van Leeuwenhoek. 69 (1996) 193-202.

- [116] M. Kordel, H. Sahl, Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptides Pep 5 and nisin, *FEMS Microbiol. Lett.* 34 (1986) 139-144.
- [117] G. Bierbaum, H.G. Sahl, Induction of autolysis of staphylococci by the basic peptide antibiotics Pep 5 and nisin and their influence on the activity of autolytic enzymes, *Arch. Microbiol.* 141 (1985) 249-254.
- [118] C. Aranha, S. Gupta, K.V.R. Reddy, Contraceptive efficacy of antimicrobial peptide Nisin: in vitro and in vivo studies, *Contraception.* 69 (2004) 333-338.
- [119] A.D. Crandall, T.J. Montville, Nisin resistance in *Listeria monocytogenes* ATCC 700302 is a complex phenotype, *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (1998) 231-237.
- [120] Nisin preparation: Affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient, FDA, 1988.
- [121] Europäisches Parlament, Richtlinie über andere Lebensmittelzusatzstoffe als Farbstoffe und Süßungsmittel, 1995.
- [122] Bundesministerium für Gesundheit, Verordnung über Anforderungen an Zusatzstoffe und das Inverkehrbringen von Zusatzstoffen für technologische Zwecke (Zusatzstoff-Verkehrsverordnung - ZVerkV), 1998.
- [123] Gutachten des Wissenschaftlichen Gremiums AFC über Die Verwendung von Nisin (E 234) als Lebensmittelzusatzstoff, EFSA, 2006.
- [124] J. Wu, S. Hu, L. Cao, Therapeutic effect of nisin Z on subclinical mastitis in lactating cows, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 3131-3135.
- [125] S.M. Gupta, C.C. Aranha, J.R. Bellare, K.V.R. Reddy, Interaction of contraceptive antimicrobial peptide nisin with target cell membranes: implications for use as vaginal microbicide, *Contraception.* 80 (2009) 299-307.
- [126] N. Schnell, K.D. Entian, F. Götz, T. Hörner, R. Kellner, G. Jung, Structural gene isolation and prepeptide sequence of gallidermin, a new lanthionine containing antibiotic, *FEMS Microbiol. Lett.* 49 (1989) 263-267.
- [127] B. Ottenwälder, T. Kupke, S. Brecht, V. Gnau, J. Metzger, G. Jung, et al., Isolation and characterization of genetically engineered gallidermin and epidermin analogs, *Appl. Environ. Microbiol.* 61 (1995) 3894-3903.
- [128] H. Allgaier, G. Jung, R.G. Werner, U. Schneider, H. Zähler, Epidermin: sequencing of a heterodetic tetracyclic 21-peptide amide antibiotic, *Eur. J. Biochem.* 160 (1986) 9-22.
- [129] S. Freund, G. Jung, O. Gutbrod, G. Folkers, W.A. Gibbons, H. Allgaier, et al., The solution structure of the lantibiotic gallidermin, *Biopolymers.* 31 (1991) 803-811.
- [130] A. Manosroi, P. Khanrin, W. Lohcharoenkal, R.G. Werner, F. Götz, W. Manosroi, et al., Transdermal absorption enhancement through rat skin of gallidermin loaded in niosomes, *Int J Pharm.* (2010).
- [131] E. Jansen, D. Hirschman, Subtilin-an antibacterial product of *Bacillus subtilis*. Culturing conditions and properties., *Arch Biochem.* 4 (1944) 297-304.
- [132] P.E. Linnett, J.L. Strominger, Additional Antibiotic Inhibitors of Peptidoglycan Synthesis, *Antimicrob Agents Chemother.* 4 (1973) 231-236.
- [133] E. Ruhr, H.G. Sahl, Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on cytoplasmic and artificial membrane vesicles, *Antimicrob. Agents Chemother.* 27 (1985) 841-845.
- [134] C.J. Giffard, H.M. Dodd, N. Horn, S. Ladha, A.R. Mackie, A. Parr, et al., Structure-function relations of variant and fragment nisins studied with model membrane systems, *Biochemistry.* 36 (1997) 3802-3810.
- [135] F. Schüller, R. Benz, H.G. Sahl, The peptide antibiotic subtilin acts by formation of voltage-dependent multi-state pores in bacterial and artificial membranes, *Eur. J. Biochem.* 182 (1989) 181-186.
- [136] A.J. Driessen, H.W. van den Hooven, W. Kuiper, M. van de Kamp, H.G. Sahl, R.N. Konings, et al., Mechanistic studies of lantibiotic-induced permeabilization of phospholipid vesicles, *Biochemistry.* 34 (1995) 1606-1614.

- [137] G.N. Moll, G.C. Roberts, W.N. Konings, A.J. Driessen, Mechanism of lantibiotic-induced pore-formation, *Antonie Van Leeuwenhoek*. 69 (1996) 185-191.
- [138] R.A. Demel, T. Peelen, R.J. Siezen, B. De Kruijff, O.P. Kuipers, Nisin Z, mutant nisin Z and lacticin 481 interactions with anionic lipids correlate with antimicrobial activity. A monolayer study, *Eur. J. Biochem*. 235 (1996) 267-274.
- [139] M. Kordel, F. Schüller, H.G. Sahl, Interaction of the pore forming-peptide antibiotics Pep 5, nisin and subtilin with non-energized liposomes, *FEBS Lett*. 244 (1989) 99-102.
- [140] E. Breukink, I. Wiedemann, C. van Kraaij, O.P. Kuipers, H. Sahl, B. de Kruijff, Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic, *Science*. 286 (1999) 2361-2364.
- [141] E. Breukink, B. de Kruijff, The lantibiotic nisin, a special case or not?, *Biochim. Biophys. Acta*. 1462 (1999) 223-234.
- [142] S.-T. Hsu, E. Breukink, B. de Kruijff, R. Kaptein, A.M.J.J. Bonvin, N.A.J. van Nuland, Mapping the targeted membrane pore formation mechanism by solution NMR: the nisin Z and lipid II interaction in SDS micelles, *Biochemistry*. 41 (2002) 7670-7676.
- [143] H.E. van Heusden, B. de Kruijff, E. Breukink, Lipid II induces a transmembrane orientation of the pore-forming peptide lantibiotic nisin, *Biochemistry*. 41 (2002) 12171-12178.
- [144] E. Breukink, H.E. van Heusden, P.J. Vollmerhaus, E. Swiezewska, L. Brunner, S. Walker, et al., Lipid II is an intrinsic component of the pore induced by nisin in bacterial membranes, *J. Biol. Chem*. 278 (2003) 19898-19903.
- [145] B.B. Bonev, E. Breukink, E. Swiezewska, B. De Kruijff, A. Watts, Targeting extracellular pyrophosphates underpins the high selectivity of nisin, *Faseb J*. 18 (2004) 1862-1869.
- [146] S.-T.D. Hsu, E. Breukink, E. Tischenko, M.A.G. Lutters, B. de Kruijff, R. Kaptein, et al., The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics, *Nat. Struct. Mol. Biol*. 11 (2004) 963-967.
- [147] H.E. Hasper, B. de Kruijff, E. Breukink, Assembly and stability of nisin-lipid II pores, *Biochemistry*. 43 (2004) 11567-11575.
- [148] I. Wiedemann, E. Breukink, C. van Kraaij, O.P. Kuipers, G. Bierbaum, B. de Kruijff, et al., Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic activity, *J. Biol. Chem*. 276 (2001) 1772-1779.
- [149] R.R. Bonelli, T. Schneider, H.-G. Sahl, I. Wiedemann, Insights into in vivo activities of lantibiotics from gallidermin and epidermin mode-of-action studies, *Antimicrob. Agents Chemother*. 50 (2006) 1449-1457.
- [150] H.E. Hasper, N.E. Kramer, J.L. Smith, J.D. Hillman, C. Zachariah, O.P. Kuipers, et al., An alternative bactericidal mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II, *Science*. 313 (2006) 1636-1637.
- [151] S.-T.D. Hsu, E. Breukink, G. Bierbaum, H.-G. Sahl, B. de Kruijff, R. Kaptein, et al., NMR study of mersacidin and lipid II interaction in dodecylphosphocholine micelles. Conformational changes are a key to antimicrobial activity, *J. Biol. Chem*. 278 (2003) 13110-13117.
- [152] H. Brötz, G. Bierbaum, P.E. Reynolds, H.G. Sahl, The lantibiotic mersacidin inhibits peptidoglycan biosynthesis at the level of transglycosylation, *Eur. J. Biochem*. 246 (1997) 193-199.
- [153] T. Böttiger, T. Schneider, B. Martínez, H.-G. Sahl, I. Wiedemann, Influence of Ca(2+) ions on the activity of lantibiotics containing a mersacidin-like lipid II binding motif, *Appl. Environ. Microbiol*. 75 (2009) 4427-4434.
- [154] C. Szekat, R.W. Jack, D. Skutlarek, H. Färber, G. Bierbaum, Construction of an expression system for site-directed mutagenesis of the lantibiotic mersacidin, *Appl. Environ. Microbiol*. 69 (2003) 3777-3783.
- [155] F. Märki, E. Hänni, A. Fredenhagen, J. van Oostrum, Mode of action of the lanthionine-containing peptide antibiotics duramycin, duramycin B and C, and cinnamycin as indirect inhibitors of phospholipase A2, *Biochem. Pharmacol*. 42 (1991) 2027-2035.
- [156] J. Wink, R.M. Kroppenstedt, G. Seibert, E. Stackebrandt, *Actinomadura namibiensis* sp. nov, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. 53 (2003) 721-724.

- [157] L.R. Gardell, R. Wang, C. Ehrenfels, M.H. Ossipov, A.J. Rossomando, S. Miller, et al., Multiple actions of systemic artemin in experimental neuropathy, *Nat. Med.* 9 (2003) 1383-1389.
- [158] I. Wiedemann, T. Böttiger, R.R. Bonelli, A. Wiese, S.O. Hagge, T. Gutschmann, et al., The mode of action of the lantibiotic lactacin 3147--a complex mechanism involving specific interaction of two peptides and the cell wall precursor lipid II, *Mol. Microbiol.* 61 (2006) 285-296.
- [159] E. Breukink, A lesson in efficient killing from two-component lantibiotics, *Mol. Microbiol.* 61 (2006) 271-273.
- [160] M.H. McCormick, J.M. McGuire, G.E. Pittenger, R.C. Pittenger, W.M. Stark, Vancomycin, a new antibiotic. I. Chemical and biologic properties, *Antibiot Annu.* 3 (1955) 606-611.
- [161] F. Parenti, G. Beretta, M. Berti, V. Arioli, Teichomycins, new antibiotics from *Actinoplanes teichomyceticus* Nov. Sp. I. Description of the producer strain, fermentation studies and biological properties, *J. Antibiot.* 31 (1978) 276-283.
- [162] J.L. Pace, K. Krause, D. Johnston, D. Debabov, T. Wu, L. Farrington, et al., In vitro activity of TD-6424 against *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 3602-3604.
- [163] R.D. Cooper, N.J. Snyder, M.J. Zweifel, M.A. Staszak, S.C. Wilkie, T.I. Nicas, et al., Reductive alkylation of glycopeptide antibiotics: synthesis and antibacterial activity, *J. Antibiot.* 49 (1996) 575-581.
- [164] M. Steiert, F.-J. Schmitz, Dalbavancin (Biosearch Italia/Versicor), *Curr Opin Investig Drugs.* 3 (2002) 229-233.
- [165] G.M. Sheldrick, P.G. Jones, O. Kennard, D.H. Williams, G.A. Smith, Structure of vancomycin and its complex with acetyl-D-alanyl-D-alanine, *Nature.* 271 (1978) 223-225.
- [166] M.P. Williamson, D.H. Williams, Structure revision of the antibiotic vancomycin. Use of nuclear Overhauser effect difference spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society.* 103 (1981) 6580-6585.
- [167] C.M. Harris, T.M. Harris, Structure of the glycopeptide antibiotic vancomycin. Evidence for an asparagine residue in the peptide, *Journal of the American Chemical Society.* 104 (1982) 4293-4295.
- [168] M. Schäfer, T.R. Schneider, G.M. Sheldrick, Crystal structure of vancomycin, *Structure.* 4 (1996) 1509-1515.
- [169] B.K. Hubbard, C.T. Walsh, Vancomycin assembly: nature's way, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 42 (2003) 730-765.
- [170] J.S. Anderson, M. Matsushashi, M.A. Haskin, J.L. Strominger, Lipid-Phosphoacetylmuramyl-Pentapeptide and Lipid-Phosphodisaccharide-Pentapeptide: Presumed Membrane Transport Intermediates in cell wall synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 53 (1965) 881-889.
- [171] A.N. Chatterjee, H.R. Perkins, Compounds formed between nucleotides related to the biosynthesis of bacterial cell wall and vancomycin, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 24 (1966) 489-494.
- [172] H. Molinari, A. Pastore, L.Y. Lian, G.E. Hawkes, K. Sales, Structure of vancomycin and a vancomycin/D-Ala-D-Ala complex in solution, *Biochemistry.* 29 (1990) 2271-2277.
- [173] Y. Gilbert, M. Deghorain, L. Wang, B. Xu, P.D. Pollheimer, H.J. Gruber, et al., Single-molecule force spectroscopy and imaging of the vancomycin/D-Ala-D-Ala interaction, *Nano Lett.* 7 (2007) 796-801.
- [174] D.A. Beauregard, D.H. Williams, M.N. Gwynn, D.J. Knowles, Dimerization and membrane anchors in extracellular targeting of vancomycin group antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.* 39 (1995) 781-785.
- [175] D.P. Levine, Vancomycin: a history, *Clin. Infect. Dis.* 42 Suppl 1 (2006) S5-12.
- [176] F. Van Bambeke, M.-P. Mingeot-Leclercq, M.J. Struelens, P.M. Tulkens, The bacterial envelope as a target for novel anti-MRSA antibiotics, *Trends Pharmacol. Sci.* 29 (2008) 124-134.
- [177] F. Parenti, Structure and mechanism of action of teicoplanin, *J. Hosp. Infect.* 7 Suppl A (1986) 79-83.
- [178] D.M. Campoli-Richards, R.N. Brogden, D. Faulds, Teicoplanin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential, *Drugs.* 40 (1990) 449-486.

- [179] N. Babul, M. Pasko, Teicoplanin: a new glycopeptide antibiotic complex, *Drug Intell Clin Pharm.* 22 (1988) 218-226.
- [180] G.R. Corey, M.E. Stryjewski, W. Weyenberg, U. Yasothan, P. Kirkpatrick, Telavancin, *Nat Rev Drug Discov.* 8 (2009) 929-930.
- [181] L.D. Saravolatz, G.E. Stein, L.B. Johnson, Telavancin: a novel lipoglycopeptide, *Clin. Infect. Dis.* 49 (2009) 1908-1914.
- [182] M.R. Leadbetter, S.M. Adams, B. Bazzini, P.R. Fatheree, D.E. Karr, K.M. Krause, et al., Hydrophobic vancomycin derivatives with improved ADME properties: discovery of telavancin (TD-6424), *J. Antibiot.* 57 (2004) 326-336.
- [183] C.S. Lunde, S.R. Hartouni, J.W. Janc, M. Mammen, P.P. Humphrey, B.M. Benton, Telavancin disrupts the functional integrity of the bacterial membrane through targeted interaction with the cell wall precursor lipid II, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 3375-3383.
- [184] C.S. Lunde, C.H. Rexer, S.R. Hartouni, S. Axt, B.M. Benton, Fluorescence Microscopy Demonstrates Enhanced Targeting of Telavancin to the Division Septum of *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob Agents Chemother.* (2010).
- [185] E.C. Nannini, M.E. Stryjewski, G.R. Corey, Telavancin's interactions with the bacterial cell membrane, *Future Microbiol.* 5 (2010) 355-358.
- [186] N.E. Allen, T.I. Nicas, Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics, *FEMS Microbiol. Rev.* 26 (2003) 511-532.
- [187] O. Domenech, G. Francius, P.M. Tulkens, F. Van Bambeke, Y. Dufrêne, M.-P. Mingeot-Leclercq, Interactions of oritavancin, a new lipoglycopeptide derived from vancomycin, with phospholipid bilayers: Effect on membrane permeability and nanoscale lipid membrane organization, *Biochim. Biophys. Acta.* 1788 (2009) 1832-1840.
- [188] D.R.P. Guay, Dalbavancin: an investigational glycopeptide, *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2 (2004) 845-852.
- [189] A. Kim, J.L. Kuti, D.P. Nicolau, Review of dalbavancin, a novel semisynthetic lipoglycopeptide, *Expert Opin Investig Drugs.* 16 (2007) 717-733.
- [190] B. Das, C. Sarkar, R. Biswas, S. Pandey, Review: dalbavancin--a novel lipoglycopeptide antimicrobial for gram positive pathogens, *Pak J Pharm Sci.* 21 (2008) 78-87.
- [191] M.-C. Tseng, Y.-P. Chang, Y.-H. Chu, Quantitative measurements of vancomycin binding to self-assembled peptide monolayers on chips by quartz crystal microbalance, *Anal. Biochem.* 371 (2007) 1-9.
- [192] M. Strieker, M.A. Marahiel, The structural diversity of acidic lipopeptide antibiotics, *Chembiochem.* 10 (2009) 607-616.
- [193] G.M. Eliopoulos, S. Willey, E. Reiszner, P.G. Spitzer, G. Caputo, R.C. Moellering, In vitro and in vivo activity of LY 146032, a new cyclic lipopeptide antibiotic, *Antimicrob. Agents Chemother.* 30 (1986) 532-535.
- [194] J.H. Lakey, E.J.A. Lea, B.A.M. Rudd, H.M. Wright, D.A. Hopwood, A New Channel-forming Antibiotic from *Streptomyces coelicolor* A3(2) Which Requires Calcium for its Activity, *J Gen Microbiol.* 129 (1983) 3565-3573.
- [195] B. Heinemann, M.A. Kaplan, R.D. Muir, I.R. Hooper, Amphomycin, a new antibiotic., *Antibiot Chemother.* 3 (1953) 1239-1242.
- [196] H. Naganawa, M. Hamada, K. Maeda, Y. Okami, T. Takeushi, Laspartomycin, a new anti-staphylococcal peptide, *J. Antibiot.* 21 (1968) 55-62.
- [197] L. Vértessy, E. Ehlers, H. Kogler, M. Kurz, J. Meiwes, G. Seibert, et al., Friulimicins: novel lipopeptide antibiotics with peptidoglycan synthesis inhibiting activity from *Actinoplanes friuliensis* sp. nov. II. Isolation and structural characterization, *J. Antibiot.* 53 (2000) 816-827.
- [198] J.I. Shoji, S. Kozuki, S. Okamoto, R. Sakazaki, H. Otsuka, Studies on tsushimycin. I. Isolation and characterization of an acidic acylpeptide containing a new fatty acid, *J. Antibiot.* 21 (1968) 439-443.
- [199] F.M. Huber, R.L. Pieper, A.J. Tietz, The formation of daptomycin by supplying decanoic acid to *Streptomyces roseosporus* cultures producing the antibiotic complex A21978C, *Journal of Biotechnology.* 7 (1988) 283-292.

- [200] L. Verbist, In vitro activity of LY146032, a new lipopeptide antibiotic, against gram-positive cocci, *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 (1987) 340-342.
- [201] H. Faruki, A.C. Niles, R.L. Heeren, P.R. Murray, Effect of calcium on in vitro activity of LY146032 against *Clostridium difficile*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 31 (1987) 461-462.
- [202] L. Robbel, M.A. Marahiel, Daptomycin, a bacterial lipopeptide synthesized by a nonribosomal machinery, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 27501-27508.
- [203] S.W. Ho, D. Jung, J.R. Calhoun, J.D. Lear, M. Okon, W.R.P. Scott, et al., Effect of divalent cations on the structure of the antibiotic daptomycin, *Eur. Biophys. J.* 37 (2008) 421-433.
- [204] J.A. Silverman, N.G. Perlmutter, H.M. Shapiro, Correlation of daptomycin bactericidal activity and membrane depolarization in *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 2538-2544.
- [205] D. Jung, A. Rozek, M. Okon, R.E.W. Hancock, Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin, *Chem. Biol.* 11 (2004) 949-957.
- [206] W.R.P. Scott, S.-B. Baek, D. Jung, R.E.W. Hancock, S.K. Straus, NMR structural studies of the antibiotic lipopeptide daptomycin in DHPC micelles, *Biochim. Biophys. Acta.* 1768 (2007) 3116-3126.
- [207] S.K. Straus, R.E.W. Hancock, Mode of action of the new antibiotic for Gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides, *Biochim. Biophys. Acta.* 1758 (2006) 1215-1223.
- [208] J.K. Hobbs, K. Miller, A.J. O'Neill, I. Chopra, Consequences of daptomycin-mediated membrane damage in *Staphylococcus aureus*, *J. Antimicrob. Chemother.* 62 (2008) 1003-1008.
- [209] A. Muthaiyan, J.A. Silverman, R.K. Jayaswal, B.J. Wilkinson, Transcriptional profiling reveals that daptomycin induces the *Staphylococcus aureus* cell wall stress stimulon and genes responsive to membrane depolarization, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 980-990.
- [210] R.H. Baltz, Daptomycin: mechanisms of action and resistance, and biosynthetic engineering, *Curr Opin Chem Biol.* 13 (2009) 144-151.
- [211] S. Dubrac, I.G. Boneca, O. Poupel, T. Msadek, New Insights into the WalK/WalR (YycG/YycF) Essential Signal Transduction Pathway Reveal a Major Role in Controlling Cell Wall Metabolism and Biofilm Formation in *Staphylococcus aureus*, *J. Bacteriol.* 189 (2007) 8257-8269.
- [212] T. Fukushima, H. Szurmant, E.-J. Kim, M. Perego, J.A. Hoch, A sensor histidine kinase coordinates cell wall architecture with cell division in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.* 69 (2008) 621-632.
- [213] T. Fukushima, I. Furihata, R. Emmins, R.A. Daniel, J.A. Hoch, H. Szurmant, A role for the essential YycG sensor histidine kinase in sensing cell division, *Mol. Microbiol.* 79 (2011) 503-522.
- [214] N. Cotroneo, R. Harris, N. Perlmutter, T. Beveridge, J.A. Silverman, Daptomycin exerts bactericidal activity without lysis of *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 2223-2225.
- [215] I. Raad, H. Hanna, Y. Jiang, T. Dvorak, R. Reitzel, G. Chaiban, et al., Comparative activities of daptomycin, linezolid, and tigecycline against catheter-related methicillin-resistant *Staphylococcus bacteremic* isolates embedded in biofilm, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 1656-1660.
- [216] A.-B. Hachmann, E.R. Angert, J.D. Helmann, Genetic analysis of factors affecting susceptibility of *Bacillus subtilis* to daptomycin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 1598-1609.
- [217] E. Heinzlmann, S. Berger, O. Puk, B. Reichenstein, W. Wohlleben, D. Schwartz, A glutamate mutase is involved in the biosynthesis of the lipopeptide antibiotic friulimycin in *Actinoplanes friuliensis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 47 (2003) 447-457.
- [218] E. Heinzlmann, S. Berger, C. Müller, T. Härtner, K. Poralla, W. Wohlleben, et al., An acyl-CoA dehydrogenase is involved in the formation of the Delta cis3 double bond in the acyl residue of the lipopeptide antibiotic friulimycin in *Actinoplanes friuliensis*, *Microbiology (Reading, Engl.)*. 151 (2005) 1963-1974.

- [219] C. Müller, S. Nolden, P. Gebhardt, E. Heinzelmann, C. Lange, O. Puk, et al., Sequencing and analysis of the biosynthetic gene cluster of the lipopeptide antibiotic Friulimicin in *Actinoplanes friuliensis*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 1028-1037.
- [220] First Time in Man Trial for Friulimicin B - Full Text View - ClinicalTrials.gov, (2007).
- [221] G. Bunkóczi, L. Vértessy, G.M. Sheldrick, Structure of the lipopeptide antibiotic tsushimycin, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 61 (2005) 1160-1164.
- [222] T. Schneider, K. Gries, M. Josten, I. Wiedemann, S. Pelzer, H. Labischinski, et al., The lipopeptide antibiotic Friulimicin B inhibits cell wall biosynthesis through complex formation with bactoprenol phosphate, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 1610-1618.
- [223] K. Reder-Christ, H. Falkenstein-Paul, G. Klocek, S. Al-Kaddah, U. Bakowsky, G. Bendas, Model membrane approaches to determine the role of calcium for the antimicrobial activity of friulimicin, *Int J Antimicrob Agents.* (2011).
- [224] C.J. Arnusch, A.M.J.J. Bonvin, A.M. Verel, W.T.M. Jansen, R.M.J. Liskamp, B. de Kruijff, et al., The vancomycin-nisin(1-12) hybrid restores activity against vancomycin resistant *Enterococci*, *Biochemistry.* 47 (2008) 12661-12663.
- [225] H. Bauke Albada, C.J. Arnusch, H.M. Branderhorst, A.-M. Verel, W.T.M. Janssen, E. Breukink, et al., Potential scorpionate antibiotics: targeted hydrolysis of lipid II containing model membranes by vancomycin-TACzyme conjugates and modulation of their antibacterial activity by Zn-ions, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 19 (2009) 3721-3724.
- [226] J.B. Chaires, Calorimetry and thermodynamics in drug design, *Annu Rev Biophys.* 37 (2008) 135-151.
- [227] P. Williamson, K. Mattocks, R.A. Schlegel, Merocyanine 540, a fluorescent probe sensitive to lipid packing, *Biochim. Biophys. Acta.* 732 (1983) 387-393.
- [228] G. Bendas, K. Schubert, P. Nuhn, Use of merocyanine 540 for the fluorimetric detection of liposome membrane properties before and after lyophilisation and rehydration, *Pharmazie.* 53 (1998) 43-46.
- [229] J.K. Judice, J.L. Pace, Semi-synthetic glycopeptide antibacterials, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 13 (2003) 4165-4168.
- [230] L. Yu, M. Zhong, Y. Wei, Direct fluorescence polarization assay for the detection of glycopeptide antibiotics, *Anal. Chem.* 82 (2010) 7044-7048.
- [231] D.L. Higgins, R. Chang, D.V. Debatov, J. Leung, T. Wu, K.M. Krause, et al., Telavancin, a multifunctional lipoglycopeptide, disrupts both cell wall synthesis and cell membrane integrity in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 49 (2005) 1127-1134.
- [232] E. Breukink, P. Humphrey, B. Benton, I. Visscher, Evidence for a multivalent interaction between telavancin and membranebound lipid II, in: 46th Intersci. Conf. Antimicrob. Agents Chemother. American Society for Microbiology, Washington, 2006.
- [233] K.S. Rotondi, L.M. Gierasch, A well-defined amphipathic conformation for the calcium-free cyclic lipopeptide antibiotic, daptomycin, in aqueous solution, *Biopolymers.* 80 (2005) 374-385.
- [234] N. Cotroneo, R. Harris, N. Perlmutter, T. Beveridge, J.A. Silverman, Daptomycin exerts bactericidal activity without lysis of *Staphylococcus aureus*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 52 (2008) 2223-2225.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Die Hauptsätze der Thermodynamik und ihre Aussagen	32
Tabelle 2: Kalorimetrische Messmethoden.....	35
Tabelle 3: Wichtige Antibiotikaklassen	40
Tabelle 4: Einteilung wichtiger Lantibiotika	44
Tabelle 5: Einteilung wichtiger Glykopeptide.....	61
Tabelle 6: Einteilung wichtiger Lipopeptide	68
Tabelle 7: Verwendete Messgeräte.....	76
Tabelle 8: Vermessene Peptidantibiotika	76
Tabelle 9: Verwendete Phospholipide und Zellwandvorstufen	76
Tabelle 10: Eingesetzte Chemikalien und ihre Bezugsquellen	77
Tabelle 11: Sonstige Materialien und ihre Bezugsquellen.....	77
Tabelle 12: Reinigungsprotokolle für QCM-, CV- und SAW-Quarze.....	80
Tabelle 13: Durchgeführte Messungen in dieser Dissertation.....	89
Tabelle 14: Statistische Signifikanz	89
Tabelle 15: Übersicht der Biosensoren mit Messprinzipien und Auswertung	90
Tabelle 16: MIC-Bestimmungen für Gallidermin und Vancomycin.....	92
Tabelle 17: QCM-Bindungskinetik für Gallidermin und Vancomycin an DOPC \pm Lipid II.....	92
Tabelle 18: QCM-Bindungskinetik für Nisin an DOPC \pm Lipid II.....	94
Tabelle 19: CV-Untersuchungen für Gallidermin, Vancomycin und Nisin an DOPC \pm Lipid II..	95
Tabelle 20: SAW-Ergebnisse für Gallidermin an DOPC \pm Lipid II	96
Tabelle 21: ITC-Ergebnisse für Gallidermin und Vancomycin an DOPC \pm Lipid II.....	98
Tabelle 22: ITC-Messungen für Nisin an DOPC \pm Lipid II	101
Tabelle 23: Wirkmechanismus des Gallidermins	108
Tabelle 24: QCM-Bindungskinetik für Telavancin an DOPC \pm Lipid II.....	109
Tabelle 25: ITC-Messungen für Telavancin an DOPC \pm Lipid II	110
Tabelle 26: Wirkmechanismus des Telavancins	114
Tabelle 27: Wirkmechanismus des Friulimicins	122
Tabelle 28: QCM-Bindungskinetik für Daptomycin an DOPC/PG \pm Lipid II	122
Tabelle 29: ITC-Ergebnisse für Daptomycin an DOPC \pm Ca	125
Tabelle 30: Wirkmechanismus des Daptomycins	128

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Funktionsweise eines Biosensors.....	13
Abbildung 2: Einteilung der Biosensoren nach Biorezeptor und Wandler	13
Abbildung 3: Schnittwinkel und Dickenscherschwungung eines AT-Quarzes.....	16
Abbildung 4: Frequenzverlauf einer QCM-Messung	19
Abbildung 5: Rayleigh Wellenausbreitung.....	21
Abbildung 6: Love-Wellenpropagation.....	21
Abbildung 7: Scatchard-Plot einer zur Ermittlung des K_D -Wertes.....	23
Abbildung 8: Kinetik-Modell nach nichtlinearer Regression	23
Abbildung 9: Zyklus einer CV-Messung.....	27
Abbildung 10: Zyklovoltammogramm des Eisen Redoxpaares.....	30
Abbildung 12: ITC-Thermogramm einer exothermen Bindungsreaktion	36
Abbildung 13: Angriffspunkte von Antibiotika an Bakterienzellen.....	40
Abbildung 14: Zellwandbiosynthese in <i>Staphylococcus aureus</i>	41
Abbildung 15: Hemmung der Zellwandbiosynthese in <i>Staphylococcus aureus</i>	42
Abbildung 16: Strukturen ungewöhnlicher AS in Lantibiotika	43
Abbildung 17: Posttranslationale Modifikationen am Lantibiotikum Nisin	46
Abbildung 18: Struktur des Nisin Z.....	47
Abbildung 19: Struktur des Gallidermins	50
Abbildung 20: Struktur des Subtilins	51
Abbildung 21: Struktur des Pep5.....	51
Abbildung 22: Struktur des Microbisporicins.....	52
Abbildung 23: Dualer Wirkmechanismus des Nisins	55
Abbildung 24: Struktur des Mersacidins	57
Abbildung 25: Struktur des Labyrinthopeptin A2	59
Abbildung 26: Strukturen des Lacticins 3147 A1 und A2.....	60
Abbildung 27: Struktur des Vancomycins.....	62
Abbildung 28: Struktur des Telavancins.....	65
Abbildung 29: Struktur des Daptomycins	69
Abbildung 30: Struktur des Friulimicins.....	72
Abbildung 31: Größenvergleich eines QCM-, CV- und SAW-Quarzes.....	79
Abbildung 32: Quarzsensormit einer Selfassembling Monolayerschicht	80
Abbildung 33: Langmuir-Blodgett Technik zur Übertragung einer Phospholipidfilms.....	81
Abbildung 34: Aufbau der QCM- und CV-Messzellen.....	82
Abbildung 35: SAW-Quarz mit Mercaptoundecylaminschicht	82
Abbildung 36: QCM LiquiLab21 und seine Bauteile.....	84
Abbildung 37: SAW Biosensorsystem mit Bauteilen im Detail.....	86
Abbildung 38: VP-ITC-Aufbau im Detail und Thermovac	87
Abbildung 39: Wirkmechanismen der der Peptidantibiotika an bakteriellen Membranen.....	91
Abbildung 40: QCM-Bindungskonstanten von Gallidermin und Vancomycin an DOPC \pm Lipid II	93
Abbildung 41: Assoziations- und Dissoziationskonstanten von Gallidermin und Vancomycin an DOPC \pm Lipid II.....	94
Abbildung 42: SAW-Messung des Gallidermins an DOPC \pm Lipid II	96
Abbildung 43: ITC-Kurven von Gallidermin und Vancomycin an DOPC.....	99
Abbildung 44: ITC-Kurven von Gallidermin und Vancomycin an DOPC+Lipid II	100
Abbildung 45: ITC-Kurven von Nisin an DOPC \pm Lipid II.....	101

Abbildung 46: Kumulierte Wärmen von Nisin an DOPC	102
Abbildung 47: ITC-Kurven von Gallidermin und Vancomycin an DOPC+C55P	103
Abbildung 48: Gebundener Anteil des Gallidermins an DOPC-, +C55P, +Lipid II	104
Abbildung 49: Kumulierte Wärmen von Gallidermin an DOPC- , +C55P, +Lipid II	104
Abbildung 50: Emission des Farbstoffs Merocyanin MC 540 bei DOPC-Liposomen und nach Zusatz von Gallidermin bzw. Vancomycin.....	106
Abbildung 51: Wirkmechanismen von Vancomycin und Gallidermin.....	107
Abbildung 52: ITC-Verläufe für Telavancin an DOPC \pm Lipid II.....	111
Abbildung 53: Enthalpien von Gallidermin, Telavancin und Vancomycin an DOPC.....	112
Abbildung 54: Wirkmechanismus des Telavancins.....	113
Abbildung 55: AFM Aufnahmen einer DOPC-Membran und einer DOPC+C55P-Membran....	115
Abbildung 56: Friulimicin-Aggregate auf einer DOPC- und DOPC+C55P-Schicht	116
Abbildung 57: Detaillierte AFM Aufnahmen einer DOPC+C55P-Schicht mit Friulimicin	117
Abbildung 58: Sektionsanalyse der DOPC+C55P-Schicht nach Zugabe von Friu-Ca	117
Abbildung 59: ITC-Verläufe für Friulimicin an DOPC \pm C55P \pm Calcium	118
Abbildung 60: Kumulierte Wärmen für die Friulimicin bei DOPC \pm C55P \pm Calcium	120
Abbildung 61: Wirkmechanismus des Friulimicins.....	121
Abbildung 62: SAW-Messung von Daptomycin an DOPC+DOPG \pm Lipid II.....	123
Abbildung 63: SAW-Messung von Daptomycin-Ca an DOPC+DOPG \pm Lipid II.....	124
Abbildung 64: ITC-Messung für Daptomycins an DOPC \pm Calcium.....	126
Abbildung 65: Kumulative Wärmen für Daptomycin an DOPC \pm Calcium	126
Abbildung 66: Wirkmechanismus des Daptomycins	128

Verfassererklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Bonn, 24.11.2011

Saad Al-Kaddah